



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES AVANZADOS, S. C.
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**“INDUCCION LIPIDICA POR LIMITACION DE
NUTRIENTES EN LAS MICROALGAS *Scenedesmus
dimorphus* y *Chlorella sorokiniana*”**

TESIS

**que como requisito para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIA y TECNOLOGIA AMBIENTAL**

Presenta:

Ing. Carmen Rocío Maldonado Barraza

Director de Tesis:

Dr. Erasmo Orrantia Borunda

Chihuahua, Chih., México

Octubre del 2011

INDICE

Contenido

i.	GLOSARIO	6
ii.	LISTA DE TABLAS	9
iii.	LISTA DE FIGURAS	10
	RESUMEN	11
1.	INTRODUCCION	4
2.	ANTECEDENTES	9
2.1.	Biodiesel.....	10
2.1.1.	Fuentes de materia prima para la producción de biodiesel	10
•	Aceites vegetales	11
•	Aceites usados de cocina.....	12
•	<i>Grasas animales</i>	12
2.2.	Producción de biodiesel en Mundo y en México	13
2.2.1.	Biodiesel en el Mundo	13
2.2.2.	Biodiesel en México.....	14
2.2.2.1.	Legislación Existente en México	15
2.3.	Ventajas y desventajas del biodiesel frente al diesel convencional	16
2.3.1.	Ventajas.....	16

2.3.2. Desventajas	18
2.4. Las microalgas como materia prima para la producción de biodiesel.....	21
2.4.1. Información general y características de las microalgas.....	21
2.4.2. Dinámica de crecimiento	23
2.4.3. Factores físicos y químicos que afectan crecimiento microalgal	26
2.5. Biodiesel a partir de microalgas.....	30
2.5.1. Inducción del contenido de lípidos	35
2.6. Producción de biodiesel a partir de microalgas	44
3. OBJETIVOS.....	51
3.1. Objetivo general.....	52
3.2. Objetivos particulares	52
4. HIPOTESIS.....	53
5. JUSTIFICACION.....	55
6. MATERIALES Y METODOS.....	57
6.1. Selección de microalgas	58
6.2. Preparación del inóculo y aclimatación en el laboratorio	58
6.2.1. Condiciones de crecimiento	58
6.3. Cultivo de microalgas.....	59
6.3.1. Condiciones de crecimiento	60
6.3.2. Diseño del fotobioreactor	61

6.4.	Seguimiento de los cultivos.....	62
6.4.1.	Crecimiento algal.....	62
6.4.2.	Composición química de la biomasa	64
6.4.2.1.	Extracción de lípidos totales.....	64
6.4.2.1.1.	Cuantificación de lípidos totales.....	65
6.4.2.1.2.	Monitoreo del contenido lipidico.....	66
6.4.2.2.	Análisis de Proteínas totales	66
6.4.2.3.	Análisis de Carbohidratos totales	68
6.5.	Preparación de las soluciones estándar para la determinación colorimétrica de pH.....	71
6.6.	Aislamiento y purificación de la microalga.....	71
6.6.1.	Aislamiento en placas de agar.....	71
6.6.2.	Diluciones seriadas.....	72
7.	RESULTADOS.....	73
7.1.	Evaluación cuantitativa de los cultivos de <i>Scenedesmus dimorphus</i>	74
7.1.1.	Crecimiento algal.....	74
7.1.1.1.	Cuantificación de biomasa	80
7.1.1.2.	Producción de biomasa	84
7.2.	Composición química de la biomasa de <i>Scenedesmus dimorphus</i>	86
7.2.1.	Lípidos totales	86
7.2.1.1.	Producción de lípidos.....	92
7.2.1.2.	Análisis lipidico.....	94

7.2.2.	Proteínas totales	97
7.2.3.	Carbohidratos totales.....	103
7.3.	Evaluación cuantitativa de los cultivos de <i>Chlorella sorokiniana</i>	108
7.3.1.	Crecimiento algal.....	108
7.3.1.1.	Cuantificación de biomasa	112
7.3.1.2.	Producción de biomasa.....	115
7.4.	Composición química de la biomasa de <i>Chlorella sorokiniana</i>	117
7.4.1.	Lípidos totales	117
7.4.1.1.	Producción de lípidos.....	122
7.4.1.2.	Análisis lipídico.....	123
7.4.2.	Proteínas totales	125
7.4.3.	Carbohidratos totales	130
8.	DISCUSION.....	137
8.1.	Densidad celular y biomasa de <i>Chlorella sorokiniana</i> y <i>Scenedesmus dimorphus</i>	138
8.2.	Composición química de <i>Chlorella sorokiniana</i> y <i>Scenedesmus dimorphus</i> ..	142
9.	CONCLUSIONES	158
10.	RECOMENDACIONES	161
11.	LITERATURA CITADA.....	163

i. GLOSARIO

ATP: Es un nucleótido fundamental en la obtención de energía celular, se produce durante la fotosíntesis y la respiración celular. Está formado por una adenina, ribosa y tres grupos fosfatos.

Biocombustibles: Son combustibles líquidos o gaseosos que se derivan de material biológico, o biomasa.

Biodiesel: Es un biocombustible líquido que se obtiene a partir de lípidos naturales como aceites vegetales o grasas animales, mediante la transesterificación.

Bioenergía: Es la energía renovable obtenida de materiales biológicos. En su más estricto sentido es un sinónimo de biocombustibles, combustibles derivados de fuentes biológicas.

Biomasa: Materia orgánica originada en un proceso biológico, utilizable como fuente de energía.

***Chlorella sorokiniana*:** Microalga verde dulceacuícola, tiene un tamaño de entre 2-10 μm , presenta un contenido de lípidos de 18-23%, se reproduce a un ritmo extremadamente rápido, es conocida por ser rica en nutrientes ya que provee de los aminoácidos esenciales, también es una fuente confiable de ácidos grasos, clorofila y betacaroteno.

Cultivo batch: Sistema más simple y más utilizado en cultivos de microalgas, consiste en añadir una pequeña cantidad de microalgas en un volumen determinado permitiendo agotar los nutrientes de manera natural.

Deficiencia de nutrientes: En un cultivo de microalgas, la deficiencia de nutrientes se logra cuando el suministro exógeno se agota y la célula se ve obligada a utilizar sus reservas endógenas

Estrés celular: Estado de agotamiento, desajuste, debilitamiento, presión, choque o alteración fisiológica que presenta un organismo como consecuencia de las condiciones ambientales.

Fotosíntesis: Es la conversión de materia inorgánica en materia orgánica gracias a la energía que aporta la luz. Consiste básicamente, en la elaboración de azúcares a partir de CO₂ minerales y agua con la ayuda de luz solar.

Limitación de nutrientes: el cultivo generalmente crece y se adapta a un ambiente constante pero insuficiente del nutriente limitante.

Partición de carbono: Es la forma que el flujo carbono proveniente de la fotosíntesis puede tomar; ya sea en forma de proteína o componentes de reserva tales como carbohidratos o lípidos.

Scenedesmus dimorphus: Microalga verde dulceacuícola, tiene un tamaño de aproximadamente 10 µm, y presenta un contenido de lípidos de 16-40%, siendo una de las especies preferidas para la producción de biodiesel.

Transesterificación: es el proceso que convierte los aceites y grasas en biodiesel, utilizando alcohol de bajo peso molecular (metanol, etanol) y catalizado con una base o un ácido, dicha reacción produce ésteres metílicos y glicerol.

ii. LISTA DE TABLAS

iii. LISTA DE FIGURAS

RESUMEN

Algunas especies microalgales producen lípidos en abundancia y estos pueden ser utilizados para la producción de biodiesel mediante un proceso simple denominado transesterificación. Debido a sus cortos ciclos de crecimiento, alto contenido en lípidos y a la facilidad de ser modificadas genéticamente se han propuesto como candidatos potenciales para la producción de biocombustibles. No obstante, es posible inducir la síntesis de lípidos optimizando los factores determinantes del crecimiento modificando las condiciones del cultivo para someter a las células a un estrés, la limitación de nutrientes, es sin duda una estrategia viable para aumentar el contenido lipídico en las células. El presente trabajo tiene como objetivo inducir la síntesis de lípidos de dos especies de microalgas verdes del género *Chlorophyceae*; *Chlorella sorokiniana* que fue aislada del sedimentador secundario de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Chihuahua y *Scenedesmus dimorphus* microalga de origen comercial. Las células fueron cultivadas durante 15 días en sistemas estáticos o batch bajo diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo para promover un estrés nutricional e inducir la síntesis de lípidos, las células fueron cosechadas durante las distintas fases de crecimiento para evaluar la acumulación lipídica durante el desarrollo del cultivo. A su vez, se observó el comportamiento del contenido de proteínas, carbohidratos, así como la producción de biomasa, ya sea para considerar a estas especies como una posible fuente de nutrición animal, biofertilizantes o una alternativa prometedora para la producción de bioetanol.

En el presente estudio se encontró que la composición bioquímica (lípidos, proteínas y carbohidratos) de ambas microalgas se vio afectada por la fase de crecimiento, así como de la concentración de nitrógeno inicial, sin observarse efectos significativos por la concentración inicial de fósforo. Los resultados señalan que *Scenedesmus dimorphus* respondió a la inducción de lípidos por limitación y/o deficiencia de nitrógeno, registrando el contenido de lípidos más elevados durante la fase estacionaria en aquellos tratamientos que contenían los niveles más bajos de nitrógeno (S1, S2 y SC) con valores promedio de 42.11 ± 1.24 %, 38.74 ± 0.85 % y 44.03 ± 1.11 % de lípidos, respectivamente, mientras que los tratamientos que contenían una concentración mas alta de nitrógeno (S3, S4 y SN), registraron un contenido lipídico de 25.37 ± 0.76 %,

19.60 ± 1.84 % y 20.29 ± 0.84 %, respectivamente. Sin embargo, *Chlorella sorokiniana* no respondió a la inducción lipídica registrando un promedio de lípidos de aproximadamente 18.39 ± 0.57 % para cada uno de los tratamientos (promedio de todo el periodo experimental). No obstante, *Chlorella sorokiniana* registró una mayor concentración de biomasa alcanzando valores de 1.62 g l⁻¹ y 2.22 g l⁻¹ en los tratamientos C2 y CN, respectivamente, mientras que *Scenedesmus dimorphus* solamente logró 0.60 g l⁻¹ y 1.06 g l⁻¹ para los tratamientos S4 y SN, respectivamente. A pesar de que *Chlorella sorokiniana* no mostró una inducción lipídica, registró una mayor productividad de lípidos que *Scenedesmus dimorphus* debido a las altas tasa de crecimiento que esta presentó. *Chlorella sorokiniana* al no responder a una inducción lipídica, los resultados muestran que uso a los carbohidratos como principal componente de reserva, registrando en todo momento una mayor contenido concentración de carbohidratos que *Scenedesmus dimorphus*. Los valores más bajos de este constituyente se registraron durante la fase exponencial, mientras que los valores más altos se presentaron durante la fase estacionaria observándose un mayor contenido de carbohidratos en aquellos tratamientos que contenían las concentraciones más bajas de nitrógeno. Los valores más altos de carbohidratos en *Chlorella sorokiniana* fueron 62.02 ± 5.54 %, 62.09 ± 4.36 % en los tratamientos C1 y CC, mientras que en *Scenedesmus dimorphus* fueron 40.14 ± 2.58 %, 38.79 ± 0.50 % y 38.02 ± 2.02 % para los tratamientos S1, S2, SC, respectivamente.

En ambas especies el contenido de proteína fue mayor durante la fase de crecimiento exponencial, pero la situación cambió en la fase estacionaria, ya que los lípidos y carbohidratos aumentaron durante el desarrollo de los cultivos y fueron los principales componentes de reserva. *Chlorella sorokiniana* registró un mayor contenido en proteína alcanzando valores promedio de 64.97 ± 4.02 %, para cada uno de los tratamientos, mientras que *Scenedesmus dimorphus* registró solamente 44.45 ± 2.08 % de proteína en cada tratamiento. En todos los casos, la concentración de proteína disminuyó en el desarrollo del cultivo, observándose en mayor medida en aquellos tratamientos que se cultivaron con bajas concentraciones de nitrógeno.

Aunque *Scenedesmus dimorphus* respondió a la inducción de lípidos, registró bajas tasas de crecimiento y por lo tanto una baja concentración de biomasa sin efecto beneficioso en términos de productividad de lípidos. Dichos parámetros afectan la viabilidad económica del aceite de microalgas para la producción de biodiesel. Caso contrario sucedió con *Chlorella sorokiniana* que al no presentar un alto contenido lipídico sus altas tasas de crecimiento traducidas a elevadas concentraciones de biomasa condujo a productividades de lípidos superiores.

La inducción de lípidos por limitación de nutrientes, parece ser una estrategia viable para aumentar el contenido de lípidos en las células, no obstante, desde el punto de vista técnico, al cultivar las células en condiciones limitantes de nutrientes y carecer de una concentración adecuada para su desarrollo, limitan el crecimiento celular afectando negativamente la producción de lípidos.

De los resultados obtenidos se puede inferir que *Chlorella sorokiniana* es una fuente prometedora para la generación de biocombustibles debido a las elevadas tasas de crecimiento y productividad de lípidos, además de que crece perfectamente en condiciones limitantes de nutrientes. Asimismo, puede ser usada para alimento para ganado debido al elevado contenido de proteína y posible conversión a bioetanol debido a los altos valores de carbohidratos que presenta, además de que al ser nativa de la región se exhorta a proponer una alternativa de cultivo que sea económicamente viable y de fácil acceso como las aguas residuales de donde fue aislada.

Palabras clave: *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus dimorphus*, lípidos, proteínas, carbohidratos, productividad de lípidos.

1. INTRODUCCION

Recientemente, el mundo enfrenta la peor crisis de energética en la historia, debido al agotamiento de los combustibles fósiles y al elevado precio del petróleo que ha estado aumentando a niveles record en los últimos años. La incesante demanda energética causada por la creciente industrialización y el elevado crecimiento demográfico trae consigo incalculables daños al medio ambiente tales como la contaminación local del aire causado por la emisión de gases con efecto invernadero, lluvia acida y cambio climático, todo esto a causa de la desmedida utilización de combustibles fósiles. Por tanto, una solución posible a esta crisis es encontrar fuentes de energía alternativa sostenible (renovable) y que sea económicamente viable. Por ello, la comunidad científica está en la búsqueda de soluciones que permitan la sustitución ya sea total o parcial a los combustibles fósiles.

Existen muchas fuentes de energía alternativa como la eólica, solar, geotérmica y de biomasa que cumplen con el primer criterio (la sostenibilidad), sin embargo, pocos de ellos pueden cumplir con el segundo criterio (viabilidad económica). Los investigadores señalan, que la mejor opción para el cumplimiento de ambos criterios son los biocombustibles. Los biocombustibles, son combustibles que se derivan de material de origen biológico, o biomasa. Entre ellos, el biodiesel ha recibido mayor atención debido a la similitud que presenta ante el diesel convencional en términos de estructura química.

El biodiesel es un combustible renovable que se compone de esteres monoalquílicos (etil o metil éster) de ácidos grasos, producido de manera convencional a partir de las grasas animales y aceites de desecho (Mata *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009) y se considera técnicamente capaz de sustituir al diesel derivado de petróleo. La transesterificación o alcoholisis es la reacción química para producir biodiesel ocurrida entre los aceites (triglicéridos) y un alcohol (comúnmente metanol etanol) (Demirbas, 2011; Atadashi *et al.*, 2010).

Actualmente los aceites vegetales son la principal materia prima para la producción de biodiesel. Entre ellos se encuentran los aceites comestibles que se derivan de la soya, palma, colza, canola (Chisti, 2007), no obstante al utilizar este tipo de aceite se pone en

riesgo a los mercados alimenticios. La *Jatropha* es una semilla altamente oleaginosa no comestible que crece en cultivos marginales que no requiere terrenos fértiles, ya que proliferan en suelos áridos pobres de nutrientes, con altos niveles de radiación y baja precipitación pluvial. No obstante, la obtención de aceite a partir de plantas oleaginosas (comestibles y no comestibles), está limitada por varios inconvenientes tales como: largos periodos de producción (meses o años), la dependencia a las condiciones climáticas, ubicación geográfica, fertilidad de suelos y el principal obstáculo es la extensa superficie de cultivo requerido y las grandes cantidades de agua necesarias para el riego (Yusuf *et al.*, 2011; Jidon, Naoko 2010; Mata *et al.*, 2009).

Una fuente prometedora para la producción de biodiesel es la producción biológica de lípidos. En base a la eficiencia de producción, las microalgas son una fuente atractiva de lípidos como precursores en la producción de biodiesel. Al utilizar estos microorganismos no se compromete la producción de alimentos destinados al consumo humano o de forrajes ni de otros productos derivados de cultivo de plantas superiores.

Las microalgas son reconocidas como una de las más antiguas formas de vida, son plantas primitivas (talofitas), es decir, carecen de raíces tallos y hojas, tienen clorofila *a* como pigmento fotosintético primario y pueden completar un ciclo reproductivo en cuestión de días. Su mecanismo fotosintético es similar al de las plantas superiores, aunque supera la tasa de rendimiento fotosintético de las plantas. La estructura de las microalgas es principalmente la conversión de energía y su simple desarrollo les permite adaptarse a las condiciones ambientales y prosperar a largo plazo. Debido a que su ciclo de vida ocurre en un medio líquido, tienen acceso directo (a través de su membrana celular) a nutrientes, gases y otras sustancias disueltas necesarias para su desarrollo óptimo. Algunas microalgas son capaces de duplicar su masa varias veces al día y generar una producción de aceite por hectárea de cultivo, por lo menos 30 veces mayor a otras fuentes alternativas como la colza, palma, soya y *Jatropha*.

Además pueden crecer bajo condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad, las instalaciones del cultivo se pueden construir sobre tierras áridas, desérticas, costeras no aptas para la agricultura convencional, asimismo, crecen en diversos hábitats tales

como agua dulce, salobre, en el mar, cuerpos de agua hipersalinas y en las aguas residuales. Una ventaja adicional estriba en la posibilidad de obtener subproductos (proteína, carbohidratos, biopolímeros, pigmentos, etc.) a partir de la biomasa residual una vez que los lípidos han sido extraídos. Inclusive, resulta factible el empleo de alguno de estos residuos en la alimentación humana o animal y en la producción de fertilizantes o de otros biocombustibles.

Los grupos más importantes de microalgas en términos de abundancia son: las diatomeas, algas verdes, algas rojas, algas azul-verdes y algas doradas (Demirbas, 2011; Mutanda *et al.*, 2011). Sin embargo, las microalgas verdes se han propuesto como una fuente potencial para la generación de biocombustibles renovables, ya que tienen la capacidad de generar grandes cantidades de biomasa y producir los lípidos adecuados para la obtención de biodiesel (Raetz, 2009; Sarmidi 2009).

Cada especie de microalgas produce diferentes cantidades de lípidos, proteínas y carbohidratos en grandes cantidades durante cortos periodos de tiempo (Demirbas, 2011; Chisti, 2007). Sialve *et al* (2009), mencionan las proporciones promedio generales de los componentes bioquímicos de las microalgas; proteínas (6-52%), lípidos (7-23%) y carbohidratos (5-23%), estas proporciones son altamente dependientes de la especie y de las condiciones ambientales. Una de las ventajas más importantes de la utilización de microalgas como material biotecnológico para la implementación a biocombustibles, es que su metabolismo puede ser manipulado para cambiar la composición bioquímica de la célula, siendo esta opción atractiva para la acumulación de altos niveles de lípidos en la célula para posteriormente convertirlo a biodiesel. Esto se logra mediante simples manipulaciones en la composición química del medio de cultivo, sometiendo a la célula a condiciones de estrés que se imponen por estímulos físicos o químicos del medio ambiente (Liam, Philip, 2010). Dicho en otras palabras, el contenido oleaginoso de las microalgas puede ser controlado en función de las condiciones del cultivo. Los estímulos químicos importantes incluyen, la inanición de nutrientes principalmente nitrógeno (Feng *et al.*, 2011; Rodolfi *et al.*, 2009) y fosforo (Hu *et al.*, 2011; Guschina, Harwood, 2006), alta salinidad, pH y altas

concentraciones de CO₂. Los estímulos físicos importantes son la intensidad de la luz (Li Yantao *et al.*, 2011, temperatura (Li *et al.*, 2011; Guschina, Harwood, 2006) Además de estos factores, la fase de crecimiento y la edad del cultivo también afectan al contenido y composición de ácidos grasos, observándose un mayor contenido en fase estacionaria con respecto a la fase logarítmica (Lv *et al.*, 2010; Hsieh, Wu, 2009; Chiu *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2007). La hipótesis es que al encontrarse la célula en una situación estresante, que en este caso le esta proveyendo la limitación de nutrientes, la división celular disminuye y la célula sigue fijando carbono direccionando todo el flujo metabólico a componentes de reserva en este caso los lípidos.

Numerosas investigaciones sugieren que la limitación de nutrientes es la estrategia más eficiente para incrementar el contenido de lípidos neutros en las microalgas, en particular el de triglicéridos, además, los nutrientes son más fáciles de manipular y de bajo costo en comparación con los otros factores anteriormente mencionados, teniendo una alta influencia sobre el metabolismo de los lípidos (Lin, Lin, 2011). Sin embargo, el comportamiento de las microalgas ante la restricción de nutrientes es considerablemente variable y por tanto, no es posible establecer una tendencia generalizada entre las especies microalgales.

En el presente trabajo se sometió a las microalgas a un estrés nutricional bajo condiciones limitantes y deficientes de nutrientes para la inducción de la síntesis de lípidos, además, como afectan estas condiciones a constituyentes bioquímicos de la célula (proteínas y carbohidratos), así como la producción de biomasa. Los microorganismos utilizados fueron: *Scenedesmus dimorphus* una microalga comercial y *Chlorella Sorokiniana* una microalga de origen autóctono aislada del sedimentador secundario de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Chihuahua.

2. ANTECEDENTES

2.1. Biodiesel

El biodiesel es un combustible renovable que se compone de ésteres monoalquílicos (étil o metil éster) de ácidos grasos, producido de manera convencional a partir de las grasas animales y aceites de desecho. Mata *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009; Singh, Singh, 2009). El biodiesel es derivado de la reacción de transesterificación en donde el aceite vegetal (triglicéridos) reaccionan con un alcohol de cadena corta (comúnmente metanol, etanol, propanol o butanol) en presencia de un catalizador como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o enzimas (Demirbas, 2011; Atadashi *et al.*, 2010; Dizge *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2009; Raehtz, 2009), dejando como residuo glicerol componente de alto valor añadido, el cual después de su purificación puede ser utilizada en múltiples usos tales como la industria farmacéutica y cosmética, donde cuenta con una gran demanda (Atadashi *et al.*, 2010).

El interés por la producción de biodiesel se ha incrementado en varios países alrededor del mundo, debido a que se considera un fuerte candidato para resolver los problemas energéticos y de contaminación ambiental que se han presentado en los últimos años.

Este combustible líquido producido químicamente puede sustituir total o parcialmente al diesel fósil, ya que es considerado económicamente viable, altamente competitivo, ambientalmente aceptable y de fácil acceso (Demirbas, 2009).

2.1.1. Fuentes de materia prima para la producción de biodiesel

Las materias primas contribuyen con una porción importante al costo de producción de biodiesel, y se clasifican principalmente en tres categorías: (1) aceites vegetales, (2) aceites usados de cocina y (3) grasas animales.

- Aceites vegetales

Los aceites vegetales son la principal materia prima para la producción de biodiesel, razón por la cual el uso de cultivos de alto contenido oleaginoso ha sido estudiado exhaustivamente (Hernández *et al.*, 2009). Estos pueden provenir de aceites comestibles provenientes del maní, maíz, colza, soja, aceite de palma, oliva, canola, mostaza, girasol, coco, (Atadashi *et al.*, 2010; Byung–Hwan, Young-Soo, 2008; Singh, Singh, 2009), los anteriores son llamados biocombustibles de primera generación (Demirbas, 2011; Singh *et al.*, 2011), ya que son derivados de la biomasa comestible, este tipo de materia prima trae consigo una enorme tensión en los mercados mundiales de alimentos (Liam, Philip, 2009), dado que son productos que pueden utilizarse para el consumo humano y puede conducir al aumento de los precios de los alimentos y/o aceites. Aunado a esto, se genera una plantación extensiva de cultivos en tierra que está destinada para la agricultura, por lo tanto esta situación da lugar a la competencia de suelo y pérdida de la biodiversidad debido a la tala de bosques existentes y a la utilización de zonas de importancia ecológica (Hernández *et al.*, 2009; Mata *et al.*, 2009).

De los biocombustibles de primera generación, con el objeto de no competir con aceites comestibles, se pasó a la transición de los biocombustibles de segunda generación de (Demirbas, 2011; Singh *et al.*, 2011) donde se ha planteado el uso de aceites no comestibles procedentes de cultivos marginales, desechos procedentes de la agricultura y de residuos celulósicos forestales como el aserrín, además de fuentes de materias primas de cultivos no alimenticios, como la *Jatropha*, pongamia, semillas de caucho, mahua, jojoba y aceite de ricino. Estos cultivos marginales no requieren de terrenos fértiles, ya que proliferan en suelos áridos, pobres en nutrientes y baja precipitación pluvial; (Liam, Philip, 2010; Hernández *et al.*, 2009). Atadashi *et al* (2010), mencionan que casi todos los tipos de aceites vegetales se pueden utilizar para sustituir el diesel, pero el aceite de colza y aceite de palma pueden ser los aceites más adecuados para la producción de biodiesel. En la Tabla 1, se muestran las especies

vegetales más usadas para la elaboración de biodiesel y el rendimiento producido por las diversas fuentes.

Tabla 1: Comparación de las fuentes principales para la producción de biodiesel (Chisti, 2007).

Cultivo	Rendimiento del aceite (l/ha)
Maíz	172
Soya	446
Jatropha	1892
Coco	2698
Canola	1190
Aceite de palma	5950

Las fuentes de materia prima para la producción de biodiesel dependen por lo general de los cultivos adaptados al clima regional; por ejemplo, en los Estados Unidos, el aceite de soya es el más usado como materia prima de producción de biodiesel, mientras que la semilla de colza (canola), el aceite de palma y coco son la fuente más comunes para el biodiesel, en Europa, y en los países tropicales. (Singh, Singh, 2009). En México se pueden emplear varios tipos de cultivos oleaginosos para la obtención de biodiesel, la palma es la opción más rentable debido a que se cuenta con alrededor de 2.5 millones de hectáreas de palma disponibles.

- Aceites usados de cocina

Existen grandes cantidades de aceites de desecho de bajo costo, aunque estas se mencionan con frecuencia, no se han estudiado en la misma medida como los aceites vegetales, ya que esta alternativa no ha sido satisfactoria, debido a que poseen diferencias en sus propiedades, como la enorme cantidad de ácidos grasos libres, lo cuales resultan complejo convertir a biodiesel mediante la transesterificación

- *Grasas animales*

En lo que se refiere a grasas animales, se pueden encontrar en forma de sebo, manteca de cerdo y grasas, ellas también presentan diferencias entre sus propiedades, las grasas animales al contener altos niveles de grasas saturadas son sólidas a

temperatura ambiente, de esta manera se requiere energía extra para el cambio de fase para después ser convertidas en biodiesel (Huang, *et al.*, 2009; Singh, Singh, 2009).

2.2. Producción de biodiesel en Mundo y en México

2.2.1. Biodiesel en el Mundo

El mercado internacional de biocombustibles se encuentra todavía en una dinámica incipiente y en etapas tempranas. El biodiesel en América tiene por lo menos de 45 a 50 años de antigüedad. El biocombustible se produjo experimentalmente en el laboratorio de la Universidad de Uruguay en la década del 60. Años más tarde, se inició su producción con diferentes tipos de fuentes oleaginosas y su empleo masivo fue ganando interés en países como: Argentina, Estados Unidos, Brasil y Colombia (Atadashi *et al.*, 2010), la “tecnología del biodiesel” se ha implementado mas en países europeos que en América, siendo utilizado puro (B100) o mezclado con diesel fósil, La mezcla más utilizada en nuestros días es 20% (20 partes de biodiesel y 80 de diesel convencional) (Yusuf *et al.*, 2011; Atadashi *et al.*, 2010).

En la Unión Europea (UE), el biodiesel es el mayor biocombustible en uso, representa el 82% de la producción mundial de biocombustible (Yusuf *et al.*, 2011), lo han generado a escala industrial desde 1992. Hoy en día existen aproximadamente 245 plantas en la UE con una producción de hasta 21,904 millones de toneladas de biodiesel por año, estas plantas se encuentran principalmente en Alemania, Italia, Austria, Francia y Suecia. La producción de biodiesel en la UE utiliza hoy en día alrededor de 3 millones de hectáreas de tierra cultivable, incrementándose la producción a un 16.6% en el 2009 en comparación con el 2008. Los países con mayor producción de biodiesel en la UE son Alemania 4,933 kt/año, España 4,100 kt/año, Francia 2,505 e Italia 2,375 kt/año (<http://www.ebb-eu.org/stats.php>)

Otros países como Estados Unidos esperan convertirse para el año 2010 en el mayor mercado mundial de biodiesel, lo que representa aproximadamente el 18% del

consumo mundial (Yusuf *et al.*, 2011). La producción de biodiesel derivado de la soya fue de 2,700 kt/año en 2008, lo que representó un aumento del 56% en comparación con el año 2007 (Lozada *et al.*, 2010). Nuevos y grandes mercados para el biodiesel se esperan que surjan en países como China, India y Brasil (Yusuf *et al.*, 2011). Malasia, país del sureste asiático, es el mayor productor mundial biodiesel a partir de la palma aceitosa, en la Tabla 2 se puede observar que este país asiático esta posicionado en el primer puesto en cuanto a la producción mundial de biodiesel (Sharma, Singh., 2009).

Tabla 2: Máximos productores de biodiesel a nivel mundial.

Posición	País	Potencial de volumen (L)	Producción (\$/L) ^a
1	Malasia	14,540,000,000	\$0.53
2	Indonesia	7,595,000,000	\$0.49
3	Argentina	5,255,000,000	\$0.62
4	USA	3,212,000,000	\$0.70
5	Brasil	2,567,000,000	\$0.62
6	Países Bajos	2,496,000,000	\$0.75
7	Alemania	2,024,000,000	\$0.79
8	Filipinas	1,234,000,000	\$0.53
9	Bélgica	1,213,000,000	\$0.78
10	España	1,073,000,000	\$1.171

^a Costo medio de producción por litro, se calcula a partir de todos los precios de materia prima a disposición de los lípidos, aumento en un costo de refinación de \$0.12 a \$0.04 para la venta de subproductos.

2.2.2. Biodiesel en México

México no está libre del problema de la disminución de las reservas de petróleo, fuentes oficiales estiman que solo hay reservas para alrededor de 9.2 años. Por otro

lado, México es uno de los 13 países que generan más emisiones de CO₂ en el mundo. A partir del año 2005, México emitió 389,422 millones de toneladas de CO₂, de las cuales el 32% se generaron a partir del sector del transporte (http://www.pemex.com/files/dcf/Reservas2007_e_080326.pdf, Lozada *et al.*, 2010).

Según la Comisión Nacional para el Uso Eficiente de la Energía (CONUEE), menciona que actualmente la bioenergía representa el 8% del consumo de energía primaria en México, y utiliza materia orgánica como energético, por combustión directa o mediante su conversión en combustibles gaseosos como el biogás o líquidos como el bioetanol o biodiesel.

La producción de biodiesel a escala comercial puede ser factible en México en el mediano plazo de realizar acciones integrales, mismas que deben incluir aspectos técnicos, económicos y medioambientales en conjunto con el sector agrario y agroindustrial así como un esfuerzo en investigación y desarrollo tecnológico. La Secretaría de Energía informa que en México se están estudiando como insumos para este combustible a la semilla de colza, *Jatropha*, girasol y cártamo, así como el uso de sebo animal y aceite reciclado.

El instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias llevo a cabo un estudio que estima el potencial para el cultivo de aceite de palma. Tomando en cuenta las necesidades como el agua, la temperatura, suelo y la fertilidad, este estudio encontró que hay un potencial óptimo bruto de 2,5 millones de hectáreas en México para su cultivo (Lozada *et al.*, 2010). El aceite palma se cultiva en el sureste del país, en los estados de Campeche, Chiapas, Tabasco y Veracruz (Lozada *et al.*, 2010), y su producción anual fue de 367,084 toneladas en el 2009 (http://reportes.siap.gob.mx/aagricola_siap/ientidad/index.jsp).

2.2.2.1. Legislación Existente en México

Actualmente en México no se cuenta con un marco legal que permita el empleo de biodiesel como combustible en los vehículos automotores, así como una ley que permita normar la calidad y su comercialización. Uno de los primeros pasos se dio

recientemente con la aprobación de la Ley para el Desarrollo y Promoción de los bioenergéticos y que según sus creadores, permitirá impulsar la producción de insumos para bioenergéticos con el fin de promover condiciones que garanticen el apoyo al sector agroindustrial y rural de México. ([http://www.energia.gob.mx/webSener/res/Acerca de/SENER01022008.pdf](http://www.energia.gob.mx/webSener/res/Acerca_de/SENER01022008.pdf)).

Sin embargo, esta ley establece solo la inserción de bioenergéticos como el bioetanol sin especificar claramente los mecanismos financieros y fiscales que utilizarán para detonar y mantener el mercado de etanol. Así mismo esta ley no contempla la obtención de biodiesel a partir de grasas animales y desechos de aceites vegetales.

Otro instrumento que está en discusión entre los legisladores es la ley para el Aprovechamiento de las Fuentes Renovables de Energía, en la cual se pretende cubrir un amplio abanico de diversas fuentes de energía renovables y su posible aplicación (electricidad, térmico, mecánicas, biocombustibles, etc. Dentro de esta ley se propone establecer un programa con metas de penetración en las energías renovables (incluyendo el etanol y el biodiésel para su uso en el transporte), compatible con un crecimiento de la oferta energética nacional.

2.3. Ventajas y desventajas del biodiesel frente al diesel convencional

2.3.1. Ventajas

El biodiesel utilizado como combustible líquido presenta ventajas energéticas medioambientales y económicas.

Los motores diesel de hoy requieren de un combustible que sea limpio al quemarlo, además de permanecer estable bajo las distintas condiciones en las que opera. El biodiesel es el único combustible alternativo que puede usarse directamente en cualquier motor diesel, sin ser necesario ningún tipo de modificación. Sus propiedades

son similares al diesel convencional ya que la cadena del aceite del diesel es alrededor de 15, el cual es similar a los aceites de plantas vegetales que está compuesto entre 14-18 carbonos (Huang *et al.*, 2009), debido a estas similitudes en sus propiedades se puede mezclar en cualquier proporción, sin ningún tipo de problema (Atadashi *et al.*, 2010) por lo tanto tiene el potencial para ser un biocombustible alternativo a largo plazo. (Sharma, Singh, 2009)

Así que al ser un combustible renovable es capaz de ser asimilado por el ambiente gracias a su naturaleza química, puede ser descompuesto por microorganismos (principalmente bacterias aerobias) en un periodo de tiempo relativamente corto, se degrada de 4 a 5 veces más rápido que el diesel convencional, lo cual ayuda a minimizar el impacto en caso de derrame accidental. Un resumen de estas características se presenta en la tabla 3

Tabla 3: Principales ventajas de la producción de biodiesel

Ventajas del Biodiesel
<ul style="list-style-type: none">• Es un recurso renovable y no finito como los hidrocarburos. (Miao, Wu, 2006; Byung – Hwan, Young-Soo, 2009; Sharma, Singh, 2009).• Reduce la liberación neta del CO₂ y el contenido de azufre, hidrocarburos, monóxido de carbono, hidrocarburos no quemados y partículas. (Byung – Hwan, Young-Soo, 2009; Sharma Y.C., Singh B., 2009).• No contiene compuestos aromáticos y otras sustancias químicas, que son perjudiciales al medio ambiente y la salud (Byung – Hwan, Young-Soo, 2009).• Posee un punto de inflamación mayor que el diesel fósil, con lo que en caso de un accidente su combustión es más tardía, alta biodegradabilidad, no es toxico (Miao, Wu, 2006; Naoko Ellis et al., 2008; Byung – Hwan, Young-Soo, 2009; Helwani et al., 2009).• El biodiesel puede reducir en un 90% de la toxicidad del aire y el 95% de los canceres en comparación al diesel común. Por lo que tampoco contiene agentes carcinogénicos. (Byung – Hwan, Young-Soo, 2009; Sharma, Singh, 2009).• Presenta un mayor poder lubricante, con lo que disminuye la necesidad de incluir aditivos en el combustible para mejorar esta propiedad. (Sharma, Singh, 2009).• Puede usarse sin necesidad de modificar los motores existentes. (Helwani et al., 2010).• Tiene propiedades similares al diesel convencional. Por lo cual es el único combustible alternativo a la utilización del diesel. (Helwani et al., 2010)• Es un combustible 100% ecológico que no daña al medio ambiente ya que está compuesto totalmente por productos vegetales y/o grasas animales.• Es fácil de usar y producir, además es energéticamente

2.3.2. Desventajas

La producción de biodiesel no solo tiene impactos positivos, también tiene puntos negativos, tanto para el medio ambiente como para el sector alimenticio.

Una de las causas es que, pese a que en las primeras producciones de biodiesel solo se utilizaban los restos de otras actividades agrícolas, muchos países, están destruyendo sus espacios naturales; incluyendo selvas y bosques con el fin de cumplir con su continua demanda. La consecuencia de esto, es justo lo contrario de lo que se

desea conseguir con la producción de biodiesel: los bosques y selvas limpian mas el aire de lo que lo hacen los cultivos que se ponen en su lugar (Yusuf *et al.*, 2011). Mientras que la materia prima del biodiesel proviene de fuentes renovables, su competencia como fuente de alimentación es de importante preocupación, dado que los aceites vegetales también pueden usarse para el consumo humano, esta situación puede conducir al aumento en el precio de los alimentos y/o aceites, haciendo aumentar el costo del biodiesel y la limitación de su uso (Jidon, Naoko 2010). La plantación extensiva y la presión para el cambio del uso de suelo para aumentar los campos de cultivo de la tierra, puede dar lugar a la competencia y pérdida de biodiversidad debido a la tala de bosques existentes y la utilización de zonas de importancia ecológica. (Mata *et al.*, 2009).

El costo de producción del biodiesel es generalmente alto, aproximadamente el doble del diesel convencional. El precio final del biodiesel depende de dos factores: el costo de la materia prima (grasas y aceites) y el del procesamiento. El costo de la materia prima es alrededor del 60-75% del total (Huang *et al.*, 2009; Mata *et al.*, 2009).

El biodiesel dentro de su estructura presenta moléculas no saturadas, esta característica le confiere un poder mas oxidativo provocando una mayor degradación y corrosión del material. Haseeb *et al.* (2010), observaron que el biodiesel no solo es corrosivo sino que también causa una degradación significativa en las propiedades como combustible, Fazal *et al.*, 2010 encontraron resultados similares.

En cuanto a las grasas y aceites se refiere existen grandes cantidades disponibles de bajo costo, como el desecho de aceites de restaurantes y grasas animales. Huang *et al.* (2009) menciona que el mayor problema para usar estos aceites y grasas es que por lo general contienen grandes cantidades de ácidos grasos libres, difíciles de convertir a biodiesel mediante transesterificación. La materia prima que contiene ácidos grasos en forma de triglicéridos son los preferidos, por ejemplo el aceite vegetal tiene más ácidos grasos en forma de triglicéridos, por lo cual, ha sido utilizado en la producción de biodiesel por algunos años. En la tabla 4, enlistan las principales desventajas del uso del biodiesel

Tabla 4: Principales desventajas de la producción de biodiesel

Desventajas del Biodiesel

- Al crear plantaciones para biocombustibles se destruyen espacios naturales, tales como bosques o selvas, o simplemente tierras que están destinadas para el consume humano.
 - Utilización de fertilizantes y agua necesarios para cultivos. Varios tipos de fertilizantes tienden a degradar los suelos al acidificarlos. El consumo de agua para el cultivo supone disminuir los volúmenes de las reservas y los caudales de los cursos de agua dulce.
 - Al comenzar a utilizarse suelo agrario para el cultivo directo de biocombustibles, en lugar de aprovechar exclusivamente los restos de otros cultivos, se ha comenzado a producir un efecto de competencia entre la producción de comida y la de biocombustibles, resultando en el aumento del precio de la comida.
 - Hasta el momento el biodiesel es más caro que el biodiesel convencional debido a los costos de la materia prima y el procesamiento.
 - Algunas grasas y aceites de bajo costo no son aptas para la producción de biodiesel debido a que las moléculas de ácidos grasos se encuentran libres y no en forma de triglicéridos
 - Las tasas de crecimiento de los cultivos para la producción de biodiesel son muy altas.
 - Las cantidades disponibles de aceites usados, grasas animales y cultivos de aceite vegetal no son suficientes para cubrir las necesidades de hoy.
-

El biodiesel a partir de aceites de cultivos vegetales y grasas animales parece ser una opción viable pero su desventaja más importante es el costo de los aceites de cultivo, por ejemplo el aceite de canola, representa el 80% de los costos totales de explotación, que sirve para producir biodiesel. Además la disponibilidad de suelo para los cultivos es limitado. Por lo tanto es necesario encontrar nuevas materias primas aptas para la producción de biodiesel. (Miao, Wu, 2006).

Una alternativa son los cultivos de microalgas, ya que contienen lípidos adecuados para que se lleve a cabo la transesterificación, (Umdu *et al.*, 2009), estos microorganismos han sido propuestos como candidatos para la producción de biocombustible debido a su eficiencia fotosintética, mayor producción de biomasa y más rápido crecimiento en comparación con otros cultivos energéticos. (Miao, Wu, 2006; Huang *et al.*, 2009).

2.4. Las microalgas como materia prima para la producción de biodiesel

2.4.1. Información general y características de las microalgas

Las algas son organismos que crecen en diferentes entornos acuáticos. Existen dos clases: las macroalgas y las microalgas, las primeras son grandes algas multicelulares, a menudo crecen en estanques, mar, ríos y arroyos. Por otra parte, las microalgas son organismos microscópicos (2-200µm) unicelulares y son reconocidas como una de las formas más antiguas de vida, carecen de raíces, tallos, hojas y tienen clorofila *a* como su principal pigmento fotosintético (Liam, Philip, 2010; Mutanda *et al.*, 2011), normalmente, crecen en suspensión en cuerpos de agua. Las microalgas se desarrollan en diversos hábitats tales como agua dulce, salobre, en el mar, cuerpos de agua hipersalinas y en las aguas residuales, abarcando una amplia gama de temperaturas y pH's (3-8.5) y nutrientes disponibles. Las microalgas son clasificadas en dos divisiones; procariotas (Cyanofita y Prochlorofita) y nueve divisiones eucariotas (Glaucofita, Rhodofita, Heterokontofita, Haptofita, Cryptofita, Dinofita, Euglenofita, Clorarachniofita y Clorofita) (Mutanda *et al.*, 2011; Chisti, 2007,2008; Li *et al.*, 2008). Sin embargo, según Khan *et al* (2009), los grupos más importantes de microalgas en términos de abundancia son: las diatomeas, algas verdes, algas rojas, algas azul-verdes y algas doradas (Demirbas, 2011; Mutanda *et al.*, 2011). Pueden ser clasificadas de acuerdo a varios parámetros tales como la pigmentación, ciclo de vida, morfología y estructura celular básica (Liam, Philip, 2010; Demirbas, 2011) Muchas especies producen grandes cantidades de triglicéridos, y por lo tanto se les conoce como algas oleaginosas (Duku *et al.*, 2010).

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismo fotosintéticos procariotas (cianobacterias) y eucariotas, crecen a través de la fotosíntesis como las plantas terrestres, su estructura unicelular simple les permite convertir fácilmente la energía solar en energía química (Harun *et al.*, 2010) y sus requerimientos nutricionales son relativamente simples y de bajo costo (luz, CO₂, N, P) (Demirbas, 2011), producen lípidos, proteínas y carbohidratos en grandes cantidades en cortos periodos de tiempo,

los cuales pueden ser procesados a biocombustibles o co-productos de mayor valor agregado.

Al encontrarse en diversos hábitats y soportar condiciones ambientales extremas, sus escasos requerimientos metabólicos, les permite adaptarse a las condiciones ambientales y prosperar a largo plazo, se les considera responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación de dióxido de carbono del planeta. Su biodiversidad es enorme, se han identificado alrededor de 40,000 especies aunque se estima que existe más de 100,000 de las cuales con frecuencia se desconoce su composición química y las particularidades de su metabolismo. (Liam, Philip, 2010).

Desde la antigüedad las microalgas se han usado como alimento humano; sin embargo, es hasta ahora que han atraído la atención para la investigación de biocombustibles, gracias a su potencial biotecnológico. El interés por las microalgas surgió en Alemania en los años cincuentas y sesentas al ser consideradas como una fuente importante de proteína de bajo costo para la nutrición humana, interés que después se extendió a países de todos los continentes. El atractivo de las microalgas posteriormente fue encausado hacia otras aplicaciones como la acuicultura.

Después de lo anterior, la biotecnología de microalgas se ha desarrollado en diferentes aplicaciones comerciales. Al ser organismos fotosintéticos, las microalgas contienen clorofila que pueden ser utilizados con fines alimenticios y cosméticos. También pueden emplearse en la industria farmacéutica ya que algunas especies de microalgas producen compuestos bioactivos tales como antioxidantes, antibióticos y toxinas. Además, los carbohidratos, proteínas y lípidos, pueden usarse como suplementos nutricionales para el consumo humano y más importante aún, el desarrollo de biotecnología de microalgas al beneficio al medio ambiente, teniendo la capacidad de reducir algunos problemas ambientales emergentes, tales como el efecto invernadero y la contaminación ambiental del agua, fijando el dióxido de carbono liberado por las plantas de energía y la eliminación de los nutrientes del agua residual, también algunas microalgas tienen la capacidad de fijar nitrógeno, absorber los metales pesados y fósforo (Dermibas, 2011; Converti *et al.*, 2009; Scragg *et al.*, 2002). La producción de

bioenergía a partir de microalgas fue contemplada desde los años cincuentas; sin embargo, a partir de la crisis energética de 1975, el potencial económico de esta tecnología fue reconocida por varios países como EUA, Japón y Australia.

Los escenarios antes mencionados muestran que las microalgas pueden ofrecer soluciones a algunos de los problemas ambientales, incluyendo la creación de valiosos productos de consumo humano (Harun *et al.*, 2010).

2.4.2. Dinámica de crecimiento

El crecimiento de un cultivo estático (batch) de microalgas se caracteriza por cinco fases (Figura 1)

- Lag o fase de adaptación

En esta fase se presenta un pequeño aumento en la densidad celular, es relativamente corta cuando los cultivos son inoculados en fase exponencial reduciendo seriamente el tiempo necesario para la ampliación de la escala. Esta fase se puede retardar cuando las microalgas son transferidas de placas de agar a un cultivo líquido. Es decir que cuando las células del inóculo no se encuentran en condiciones metabólicas adecuadas se presenta una fase de retardo en el crecimiento, por lo cual el cultivo no será exitoso. Dicho retraso se atribuye a la fisiología de adaptación del metabolismo de la célula para el crecimiento, como el aumento de los niveles enzimáticos y metabolitos implicados en la división celular y la fijación de carbono (Mata *et al.*, 2010; Arredondo, Voltolina, 2007; Lavens, Sorgeloos, 1997; Richmond, 2004).

- Fase exponencial

Durante este periodo la velocidad de crecimiento adquiere su valor máximo y, en vista de la falta de factores limitantes, permanece aproximadamente constante. Por este

motivo la concentración celular aumenta rápidamente, en función del tiempo según la función logarítmica:

$$C_t = C_0 \cdot e^{mt}$$

Donde C_t y C_0 es la concentración celular en el tiempo t y 0 respectivamente, y m es la tasa de crecimiento específico. La tasa de crecimiento específico depende principalmente de la especie, intensidad de la luz y temperatura (Mata *et al.*, 2010; Arredondo, Voltolina, 2007; Lavens, Sorgeloos, 1997; Richmond Amos 2004).

- Fase de desaceleración

En esta fase se empieza a notar un efecto de una menor disponibilidad de uno de los factores que regulan el crecimiento, por lo que las condiciones del cultivo son sub-óptimas. En consecuencia, la tasa de división celular disminuye aunque, en vista del alto número de células, la concentración celular alcanza su valor máximo

La división celular disminuye cuando los nutrientes, la luz, el pH, el dióxido de carbono u otros factores físicos o químicos empiezan a limitar el crecimiento (Mata *et al.*, 2010; Arredondo, Voltolina, 2007; Lavens, Sorgeloos, 1997; Richmond Amos 2004).

- Fase estacionaria

Durante esta fase las condiciones del cultivo son limitantes y la natalidad es igual a la mortalidad, habiendo un equilibrio entre el factor limitante y la tasa de crecimiento, lo que resulta en una densidad celular relativamente constante, por lo cual la concentración celular y los componentes de la biomasa permanecen sin cambios relevantes. Este comportamiento se debe a la baja concentración de algún nutriente esencial o a cambios en el pH, lo que acarrea poca disponibilidad del sustrato

fotosintético, o una excesiva concentración de oxígeno, aunque con frecuencia el motivo más importante es la pobre penetración de la luz causada por la alta concentración celular (efecto auto sombreado) (Mata *et al.*, 2010; Arredondo, Voltolina, 2007; Lavens, Sorgeloos, 1997; Richmond Amos 2004).

- Fase de muerte

Durante la etapa final, se deteriora la calidad del agua y los nutrientes se agotan a un nivel incapaz de sostener el crecimiento, en esta fase la mortalidad es superior a la natalidad por lo cual la densidad celular disminuye rápidamente y el cultivo finalmente colapsa. En la práctica, la muerte de los cultivos puede ser causada por varias de razones, incluyendo el agotamiento de nutrientes, la deficiencia de oxígeno, el recalentamiento del cultivo, pH y contaminación. El éxito del cultivo es mantenerlo siempre en fase exponencial (Mata *et al.*, 2010; Arredondo, Voltolina, 2007; Lavens, Sorgeloos, 1997; Richmond Amos 2004).

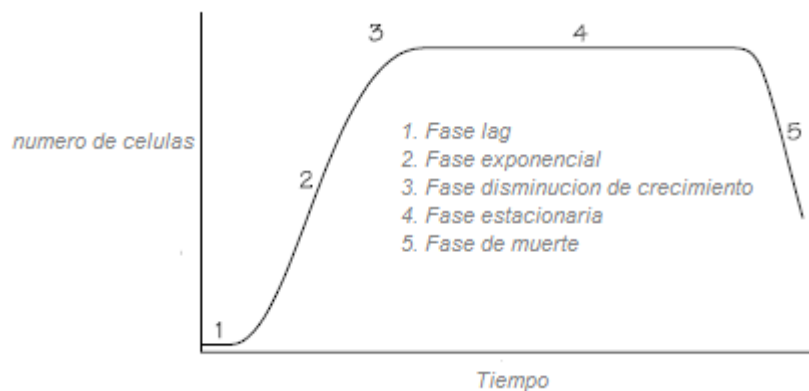


Figura 1. Representación esquemática de la dinámica de crecimiento de la microalga en un cultivo por lote.

2.4.3. Factores físicos y químicos que afectan crecimiento microalgal

Los parámetros más importantes que regulan el crecimiento de las microalgas son la cantidad y calidad de nutrientes, CO₂ luz, pH, salinidad, agitación y temperatura. Los parámetros más óptimos, así como los rangos de tolerancia son específicos para cada especie.

- Nutrientes

Para el crecimiento de las microalgas se precisa una serie de elementos inorgánicos que constituyen a la célula. Los elementos esenciales incluyen al nitrógeno, fósforo, metales y en algunos casos silicio.

El nitrógeno es suministrado principalmente en forma de nitrato (NO₃⁻), pero el amonio (NH₄⁺) y la urea también se utilizan, presentando tasas de crecimiento similares. El amonio es la fuente de nitrógeno preferido por las microalgas y la asimilación de NO₃⁻ y NH₄⁺ está relacionado con el pH. Cuando el amonio se utiliza como única fuente de nitrógeno, el pH podría disminuir significativamente debido a la liberación de H⁺. Un incremento de pH se presenta cuando el nitrato es utilizado como única fuente de nitrógeno. El contenido de nitrógeno presente en la biomasa está en el rango de 7%-10%.

El fósforo es esencial en muchos procesos celulares como la transferencia de energía, la biosíntesis de ácidos nucleicos, DNA, etc. La forma preferida en la que se suministra a las microalgas es ortofosfato (PO₄²⁻). La biomasa de microalgas contiene 1% de fósforo aproximadamente. El fósforo debe ser suministrado en exceso debido a que la mayoría de las formas en las que se encuentra están en forma de complejos metálicos, por lo que no todo el fósforo es bioasimilable.

Cerca de 30 compuestos inorgánicos y algunos compuestos orgánicos pueden ser utilizados para la alimentación de las microalgas. Otros compuestos como S, K, Na, Fe, Mg, Ca y elementos traza como B, Cu, Mn, Zn, Mo, Co, V y Se son importantes para algunas actividades enzimáticas y actividades metabólicas.

- Carbono

Las principales fuentes de carbono inorgánico para el cultivo de microalgas son el dióxido de carbono y el bicarbonato. Energéticamente, para las microalgas resulta más barato el primero puesto que aquel penetra por difusión en la célula, mientras que el bicarbonato lo hace por transporte activo. El método más empleado consiste en inyectar CO₂ mediante tubos perforados, cuidando de no generar burbujas que induzcan la flotación de las microalgas.

Las microalgas pueden fijar el CO₂ a partir de tres fuentes diferentes: el CO₂ de la atmosfera, el CO₂ de los gases de descarga de la industria y el CO₂ de los carbonatos solubles. En condiciones de crecimiento natural las microalgas asimilan el CO₂ del aire (contiene 360 ppmv de CO₂; Liam, Philip, 2010).

- Luz

La fotosíntesis es un proceso muy complejo diseñado para mantener la vida; sin embargo, el exceso de energía puede ser potencialmente dañino. Las microalgas absorben energía de la luz con el fin de oxidar el agua, proporcionando electrones que pueden enfrentarse a una serie de destinos diferentes, este proceso debe ser regulado de manera segura, ya que puede causar daño a la célula que pueden conciliarse en fotoinhibición y estrés oxidativo (Packer *et al.*, 2011).

En condiciones de crecimiento natural las microalgas fototróficas absorben la luz solar y asimilan el dióxido de carbono del aire para su conversión en materia orgánica. Al igual que como todas las plantas, la microalgas son fotosintéticas y es la luz la fuente de energía que impulsa esta reacción y en este sentido la intensidad, la calidad espectral y la necesidad de fotoperiodos. Por lo tanto la producción artificial debe tratar de replicar y mejorar las condiciones óptimas de crecimiento natural.

El uso de condiciones naturales para la producción de microalgas tiene la ventaja de utilizar la luz del sol como un recurso natural libre. Sin embargo la luz es limitada en los ciclos diurnos y las variaciones estacionales, lo que limita la viabilidad de la producción. En los sistemas de producción de microalgas al aire libre, la luz es generalmente el factor limitante, para hacer frente a las limitaciones en las condiciones de crecimiento natural, se utilizan medios artificiales empleando lámparas fluorescentes. La iluminación artificial permite una producción continua con una entrada de energía significativamente mayor. (Chen *et al.*, 2011; Liam, Philip, 2010).

La intensidad de la luz juega un papel importante, pero los requisitos varían en gran medida con la profundidad del cultivo y la densidad celular; a mayores profundidades y concentración celular la intensidad de la luz se debe aumentar para que alcance a ser penetrada a través del cultivo (1,000 lux es adecuado para frascos Erlenmeyer y 5,000-10,000 para volúmenes más grandes). Altas intensidades de luz puede causar fotoinhibición, además del recalentamiento del cultivo debido a demasiada iluminación natural y artificial. La duración de luz artificial debe ser como mínimo 18 horas de luz por día, a pesar de que los cultivos se desarrollan normalmente bajo iluminación constante.

- pH

El pH de medio de cultivo determina la solubilidad del CO₂ y de los nutrientes, así como la distribución relativa de las formas inorgánicas de carbono, influyendo directa e indirectamente en el metabolismo de las microalgas (Arredondo, Voltolina, 2007). El rango de pH para la mayoría de las especies de microalgas es de entre 7 y 9, con el rango óptimo de 8.2-8.7. Un intento por mantener un pH aceptable puede general el colapso completo del cultivo. Este último se logra mediante la aireación del cultivo. En el caso de una alta densidad celular, la adición de dióxido de carbono permite corregir el aumento de pH, lo que puede llegar a valores de límite de hasta pH 9 durante el crecimiento de microalgas.

- Agitación

La agitación es necesaria para evitar la sedimentación de las microalgas, con ello se garantiza que todas las células estén expuestas a la luz y a los nutrientes, mejorando el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire. Este último es de vital importancia ya que el aire contiene la fuente de carbono necesario para la fotosíntesis en forma de dióxido de carbono (0.03% de CO₂). Además el CO₂ amortigua el cultivo frente a cambios de pH como resultado del equilibrio CO₂/HCO₃. Dependiendo de la escala en la que se encuentre el cultivo, la agitación se puede hacer de manera manual (tubos de ensayo, erlenmeyer), aireación (bolsas, tanques), o el uso de ruedas de paletas (estanques). Sin embargo, cabe señalar que no todas las especies de microalgas pueden tolerar una agitación vigorosa.

- Temperatura

La temperatura óptima para los cultivos de microalgas es generalmente entre 20 y 24 °C, aunque esto puede variar con la composición del medio de cultivo y las especies cultivadas. Las especies comúnmente cultivadas toleran un rango de temperatura de entre 16 y 27 °C. Temperaturas inferiores a 16 °C se ralentiza el crecimiento, mientras que las superiores a 35°C son letales para algunas especies. Si es necesario, el cultivo de microalgas puede ser enfriado con un flujo de agua fría sobre la superficie del cultivo o mediante el control de la temperatura del aire con unidades de refrigeración de aire acondicionado.

- Salinidad

Las especies de microalgas marinas son muy tolerantes a los cambios en la salinidad. La mayoría de las especies crecen mejor en una salinidad que es ligeramente inferior a la de su hábitat natural, que se obtiene mediante la dilución de agua de mar con agua de grifo. El rango de salinidad óptimo es de 20 a 24 g l⁻¹.

2.5. Biodiesel a partir de microalgas

El biodiesel a partir de microalgas es considerado como biocombustible de tercera generación (Demirbas, 2011). La producción de aceite en las microalgas para su posterior transformación en biodiesel es una de las aplicaciones más prometedoras de la biotecnología de microalgas y ha sido ampliamente reconocida (De la Hoz *et al.*, 2011; Pittman *et al.*, 2011; Rodolfi *et al.*, 2009; Chisti 2007;)

En la actualidad, la forma más común para producir biodiesel proviene de cultivos oleaginosos como la palma, soja y semillas oleaginosas. Sin embargo, se han planteado varios problemas acerca de la sostenibilidad de este modo de producción, por ejemplo para producir 2,500 millones de litros de biodiesel de semillas oleaginosas (demanda actual de biodiesel en todo el Reino Unido), se necesitarían 17,5 millones de hectáreas para el cultivo, es decir, más de la mitad de la superficie terrestre del Reino Unido. (Amaro *et al.*, 2011).

Mientras que en Estados Unidos (EUA) se requieren alrededor de 0.53 mil millones de m³ de biodiesel al año, solo para satisfacer la demanda de el transporte. Si se trata de aceite de palma, que es un cultivo de alto rendimiento, solo el 24% de las tierras de EUA se le tendría que dedicar, para satisfacer el 50% de las necesidades de combustibles utilizados para el transporte, con el cultivo de microalgas solo es necesario entre el 1 y el 3% del total de la superficie de EUA que serian suficientes para satisfacer similares necesidades (Chisti, 2007).

En México, según Hernández *et al* (2009) para satisfacer el 100% de la demanda actual de diesel de petróleo, sería necesario emplear solo 1% de la extensión total del país para el cultivo de microalgas, considerando el rendimiento y la independencia a la calidad de los suelos por parte de los cultivos de microalgas.

Estos ejemplos confirman que los cultivos de aceite vegetal no pueden satisfacer la demanda de un país ni mucho menos contribuir significativamente a la sustitución de combustibles fósiles líquidos derivados del petróleo en un futuro previsible. En la tabla 5 se muestran las distintas materias primas para la producción de biodiesel incluyendo

a las microalgas, se puede observar que aunque el contenido de aceite es similar entre las distintas fuentes hay diferencias significativas en la productividad de la biomasa en general y la consiguiente producción de aceite con una clara ventaja para las microalgas (Mata *et al.*, 2009).

Tabla 5: Comparación de las microalgas con distintas materias primas para la producción de aceite (Mata *et al.*, 2009).

Fuente	Contenido de aceite de semilla (%)	Rendimiento del aceite (L aceite/ha/año)	Uso de la tierra (m ² año/kg biocombustible)	Productividad del biodiesel (kg diesel/ha/año)
Maíz	44	172	60	152
Cáñamo	33	363	31	321
Soja	18	636	18	562
Jatropha	28	741	15	656
Camelina	42	915	12	809
Semilla de colza	41	974	12	862
Girasol	40	1070	11	946
Ricino	48	1307	9	1156
Aceite de palma	36	5366	2	4747
Microalga (Bajo contenido de aceite)	30	58,700	0.2	51,927
Microalga (Contenido de aceite medio)	50	97,800	0.1	86,515
Microalga (Alto contenido de aceite)	70	136,900	0.1	121,104

Esta es la razón por la que en los últimos años ha surgido un interés en la producción de biodiesel a partir de microalgas. Las microalgas claramente presentan algunas ventajas: tienen una productividad de biomasa más alta que las plantas terrestres (los tiempos de duplicación son muy cortos 3.5 horas), algunas especies pueden acumular hasta un 20-50% (peso seco) de triglicéridos (Huang *et al.*, 2010; Chisti, 2007; Umdu *et al.*, 2010), no es necesario el uso de suelo de alta calidad para la generación de biomasa, reduciendo así al mínimo los impactos ambientales, a pesar de su crecimiento en medio acuoso, las microalgas necesitan una menor tasa de renovación del agua que los cultivos terrestres, las microalgas pueden ser cultivadas en agua salobre (evitando así la aplicación de plaguicidas o herbicidas), en aguas residuales para el aprovechamiento directo de los nutrientes (Demirbas, 2011) y en agua de mar, reduciendo la carga sobre las fuentes de agua dulce, las microalgas pueden utilizar la luz solar y pocos nutrientes de bajo costo para su crecimiento, la biomasa resultante después de la extracción del aceite puede ser procesada en etanol o metano (Chisti, 2007), que se utilizara también como biocombustibles, así como en la alimentación de ganado o simplemente se puede utilizar como abono orgánico debido a su alta relación N:P, al ser material biológico contiene un 90% de agua proporcionándole un alto valor calorífico para ser quemados para la cogeneración de energía (eléctrica y calor) (Scragg *et al.*, 2002).

Por otra parte, se generaría una amplia gama de productos químicos de interés comercial, por ejemplo, ácidos grasos poliinsaturados, colorantes y antioxidantes naturales, dependiendo de la especie en cuestión (Sarmidi, 2009). Una de sus ventajas principales es que pueden ser inducidas a producir altas concentraciones de lípidos, proteínas y carbohidratos en cortos períodos de tiempo (Sarmidi, 2009). Por último, 1 kg de biomasa seca requiere aproximadamente 1,83 kilogramos de CO₂, que puede ser fácilmente obtenido de los gases de combustión de las centrales termoeléctricas (Amaro, *et al.*, 2011; Converti *et al.*, 2009; Mata *et al.*, 2009; Yoo *et al.*, 2010; Rodolfi *et al.*, 2009).

La producción de biodiesel a partir de microalgas también presenta algunas desventajas: la producción de biomasa es generalmente más cara que los cultivos agrícolas (Yusuf Chisti, 2007; Li *et al.*, 2008), el tamaño tan pequeño de las células hace que la cosecha de la biomasa sea relativamente costosa, el alto contenido de agua que tienen después de ser cosechadas significa que el secado puede resultar un proceso que consuma bastante energía. Sin embargo, estos problemas se espera que sean superados o minimizados mediante los avances tecnológicos. Dado el enorme potencial de las microalgas no hay duda de que con el tiempo se convertirá en una de las fuentes de energía alternativa más importante. (Li *et al.*, 2008).

Las microalgas verdes se han propuesto como una fuente potencial para la generación de biocombustibles renovables, ya que tienen la capacidad de generar grandes cantidades de biomasa y producir los lípidos adecuados para la obtención de biodiesel (Raehz, 2009; Sarmidi 2009). Amaro *et al* (2011), mencionan que las especies más comunes para tal fin son; *Chlorella Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzchia*, *Phaeodactylum ssp*, *Porphyridium* ya que presentan niveles de lípidos ente el 20 y 50%, siendo la *Chlorella* una buena opción para la producción de biodiesel, Gao *et al* (2010), reportaron que la *Chlorella protothecoides* cultivadas en un medio de cultivo en condiciones heterotróficas es una buena candidata para la producción de biodiesel debido a su alto contenido de lípidos y alta densidad celular. Los lípidos adecuados para la generación de biodiesel son los lípidos neutros; triglicéridos y al igual que en los aceites provenientes de cultivos oleaginosos el biodiesel se genera a partir de la reacción de transesterificación.

Los lípidos y ácidos grasos son dependientes de la especie y varían de acuerdo a las condiciones del cultivo sin embargo el promedio entre las especies se encuentra entre el rango de 1-70% en lípidos, no obstante algunas especies pueden alcanzar el 90% bajo ciertas condiciones. (Amaro *et al.*, 2011; Demirbas, 2011).

Todas las microalgas en presencia de luz solar, convierten el CO₂ en azúcares y proteínas (Sharma., Singh, 2009) y como componentes principales de la membrana celular, cada especie de microalga contienen diferente proporción de lípidos, producto

de almacenamiento de energía (Sarmidi, 2009), de este modo, cada especie de microalga produce diferentes cantidades de lípidos, proteínas y carbohidratos durante periodos cortos de tiempo (Demirbas, 2011; Yusuf, 2007) (Tabla 6). Sialve *et al* (2009), menciona las proporciones promedio generales de los componentes bioquímicos de las microalgas; proteínas (6-52%), lípidos (7-23%) y carbohidratos (5-23%), estas proporciones son altamente dependientes de la especie y de las condiciones ambientales

Tabla 6: Composición bioquímica de las microalgas. % de biomasa seca (Demirbas, 2011).

<i>Especie</i>	Proteína	Carbohidratos	Lípidos
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-24
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1.9
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Clamydomonas reinhardii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38

<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3
<i>Pophyridium cruentum</i>	28-39	40-59	9-14
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7

El desarrollo y producción de microalgas a gran escala, se ha limitado, esto es por el alto costo que representa la producción de biomasa (Chisti, 2007). Por lo tanto es necesario mejorar la viabilidad económica del proceso biotecnológico mediante la reducción de costos y aumento de la productividad, con el fin de tener un proceso económicamente (De la Hoz *et al.*, 2011).

2.5.1. Inducción del contenido de lípidos

Las microalgas sintetizan ácidos grasos como precursores de la síntesis de varios lípidos, los cuales varían dependiendo de la especie: lípidos polares, lípidos neutros, ceras, esteroides, fosfo-lípidos, glicolípidos, carotenoides, terpenos, tocoferoles, quinonas (Hu *et al.*, 2008). Sin embargo, solo los lípidos neutros (triglicéridos) son los adecuados para la producción de biodiesel, y es posible manipular el contenido de lípidos en la célula por medio de cambios en la composición química de medio de cultivo (Mandal, Mallick 2009).

Bajo condiciones favorables de crecimiento, la mayoría de las microalgas sintetizan lípidos polares como glicolípidos y fosfolípidos, principales constituyentes de la membrana celular y los cloroplastos. Cuando las condiciones ambientales son desfavorables o de estrés para el crecimiento celular, muchas microalgas alteran sus rutas de biosíntesis de lípidos para la formación y acumulación de lípidos neutros

(Deng *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011). Por ello, es posible aumentar la síntesis y acumulación de grandes cantidades de triglicéridos mediante la optimización de los factores determinantes del crecimiento y esto se produce cuando la célula se encuentra en condiciones de estrés que se impone por estímulos físicos o químicos del medio ambiente (Liam, Philip, 2010).

Los estímulos químicos importantes incluyen, la inanición de nutrientes principalmente nitrógeno (Feng *et al.*, 2011; Rodolfi *et al.*, 2009) y fósforo (Hu *et al.*, 2011; Guschina, Harwood, 2006), alta salinidad, pH y altas concentraciones de CO₂. Los estímulos físicos importantes son la intensidad de la luz (Li Yantao *et al.*, 2011) y temperatura (Li *et al.*, 2011; Guschina, Harwood, 2006) Además de estos factores, la fase de crecimiento y la edad del cultivo también afectan al contenido y composición de ácidos grasos, observándose un mayor contenido en fase estacionaria con respecto a la fase logarítmica (Lv *et al.*, 2010; Hsieh, Wu, 2009; Chiu *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2007).

La aclimatación de las microalgas a la restricción de nutrientes se caracteriza por la manifestación de respuestas específicas para el elemento limitante, además de respuestas generales tales como cambios morfológicos (aumento de tamaño celular), cese de la división celular, alteraciones en la permeabilidad de las membranas, acumulación de lípidos y/o carbohidratos, reducción de la actividad fotosintética y modificación de los procesos metabólicos. Sin embargo, el comportamiento de las microalgas ante la restricción de nutrientes es considerablemente variable y por tanto, no es posible establecer una tendencia generalizada entre especies. La acumulación de lípidos en las microalgas, a pesar de la atenuación de la división celular, es consecuencia de la asimilación continua de carbono y su orientación hacia la síntesis activa de lípidos (o carbohidratos) como material energético de reserva.

La limitación de nitrógeno es considerada como la estrategia más eficiente para incrementar el contenido de lípidos neutros en las microalgas, en particular el de triglicéridos, además, el nitrógeno es fácil de manipular y de bajo costo en comparación con los otros factores anteriormente mencionados, teniendo una alta influencia sobre el metabolismo de los lípidos y ácidos grasos (Lin, Lin, 2011).

El principio general es que cuando hay insuficiencia de nitrógeno para la síntesis de proteínas requerida por el crecimiento, el exceso de carbono de la fotosíntesis se canaliza en moléculas de almacenamiento como triglicéridos o almidón (Amaro *et al.*, 2011).

Numerosas investigaciones se han realizado con el fin de evaluar la capacidad de algunas especies de microalgas a acumular grandes cantidades de lípidos bajo condiciones de estrés mediante la inanición de nitrógeno y fósforo. Li *et al* (2010b) observaron el efecto de la concentración de nitrógeno y fósforo en condiciones suficientes y limitantes en la acumulación de lípidos de *Scenedesmus sp.* LX1, sus resultados indican, que el contenido de lípidos aumentó a medida que disminuía la concentración de nitrógeno y/o fósforo, registrando los máximos valores de 30% y 53% de lípidos con 2.5 mg l⁻¹ de nitrógeno total y 0,1 mg l⁻¹ de fósforo total, respectivamente. la concentración de biomasa también se vio afectada, aumentando sus valores a medida que aumentaba la concentración de nitrógeno y fósforo, registrando la máxima concentración de biomasa (2.8 gl⁻¹) a una concentración inicial de nitrógeno total de 25 mg l⁻¹ y 2,0 mg l⁻¹ de fósforo total (5.5 gl⁻¹). Estos resultados fueron consistentes a los de Converte *et al* (2009) que al disminuir un 75 % la concentración de nitrógeno (1.5 a 0.375 gl⁻¹, NaNO₃) el contenido de lípidos en *N. oculata* y *C. vulgaris* aumento de 7.90 a 15.31% y de 5.90 a 16.41%, respectivamente. Resultados similares obtuvieron Li *et al.* (2008) que al cultivar a *Neochloris oleoabundans* en condiciones suficientes y deficientes de nitrógeno (3, 5, 10, 15 y 20 mM NaNO₃) observaron que la concentración de lípidos aumentaba con forme disminuía la concentración de nitrógeno y que a concentraciones superiores de 10 mM de NaNO₃ no se observaron aumentos significativos en el contenido lipidico. Como era de esperarse, el máximo contenido de lípidos se registró a 3 mM NaNO₃ (40%), sin embargo a esta concentración de nitrógeno no se presentó suficiente crecimiento celular, lo que afecta negativamente la producción de lípidos, por lo que sugiere que a una concentración inicial de 5 mM se encuentra un equilibrio óptimo entre la concentración de biomasa (2.37 gl⁻¹) y el contenido de lípidos (34%) logrando la máxima producción de lípidos (0.133 g l⁻¹d⁻¹) en este estudio.

Lv *et al* (2010) por su parte, demostraron que el contenido de lípidos decrece con el incremento de KNO_3 (0.2, 1.0, 3.0 y 5.0 mM) registrando un contenido de lípidos de 22.5%, 20.0%, 18.5% y 15.9%, respectivamente. Conclusiones similares se obtuvieron con la investigación realizada por Deng *et al* (2011), sus resultados muestran que la deficiencia de nitrógeno produjo un dramático aumento en el contenido de lípidos en la *Clamydomonas reinhardtii* y *Chlorella vulgaris*, sin embargo, el crecimiento se vio limitado. El efecto de las concentraciones iniciales de NH_4 (10.0, 5.0, 1.0, 0.1, 0.01 y 0 mM), en las dos especies, mostró atenuación del crecimiento celular en las concentraciones de 0-0.1 mM; sin embargo, el aumento de lípidos llegó a 2.0 $\mu\text{g}/10^6$ células, aproximadamente 10 veces más que los reportados en 5mM. Considerando la concentración inicial de 1mM (NH_4) con el mayor contenido de lípidos (4.38 $\mu\text{g}/200\mu\text{l}$).

Por su parte, Widjaja *et al* (2009) cultivaron a *Chlorella vulgaris* en un medio de nutrición normal (70.0 mg l^{-1} NaNO_3) y registraron un contenido de lípidos de 26%, a medida de que el cultivo avanzaba y el nitrógeno era limitante (fase estacionaria), las células se estresaron y como consecuencia de ello su tasa de crecimiento disminuyó, no obstante, el contenido de lípidos aumentó hasta 36 % después de 7 días del agotamiento del nitrógeno y 43 % después de 17 días, sin embargo, en un estudio similar Amaro *et al.* (2011) cultivaron la misma especie también en condiciones suficientes de nutrientes y obtuvieron una concentración de lípidos de entre 14 y 30 %, no obstante, obtuvieron un 70 % de lípidos debido a la deficiencia de nutrientes.

En otro estudio, Mandal y Mallick (2009) observaron la consecuencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en el contenido de lípidos en *Scenedesmus obliquus*, que al ser cultivada durante 7 días en un medio limitado de nitrógeno y 3 días en condiciones limitantes de fósforo, obtuvieron un contenido de lípidos de 43% y 29.5%, respectivamente. Sin embargo, la concentración de biomasa disminuyó viéndose afectada por dichas limitaciones. (Packer *et al.*, 2011), mencionan que la limitación de nutrientes reducen el crecimiento celular ya que es un proceso de alto consumo energético y que pesar de que el crecimiento se reduce la fijación de carbono continua

de acuerdo a las necesidades de la células aprovechado principalmente para la síntesis de compuestos de reserva como los lípidos o carbohidratos.

Las microalgas también pueden presentar una buena opción como tratamiento terciario de un agua residual domestica. El efluente secundario contiene altos niveles de nitrógeno y fósforo, por un lado estos nutrientes inorgánicos necesitan ser removidos y por otra parte son rentables para el cultivo de microalgas. Lin *et al* (2010b) estudiaron la capacidad de *Scenedesmus sp.* LX1 para remover los nutrientes de un efluente secundario, así como la acumulación de lípidos bajo tales condiciones durante 35 días. Los resultados indican que después de 15 días de cultivo el fósforo había presentado un 98% de remoción, mientras que el nitrógeno un 98.5% presentando concentraciones finales de 0.001 mg l⁻¹ y 0.24 mg l⁻¹ respectivamente. Los lípidos presentes en la fase logarítmica (día 5) fueron el 14% mostrando un repentino aumento hasta el 30% a partir del día 10 (fase estacionaria). El agotamiento de nitrógeno en el medio puede ser la razón de la acumulación de lípidos a partir del decimo día.

Existen pocos estudios que evalúen la capacidad de las microalgas de acumular lípidos en los distintos sistemas de producción. El sistema por lote permite a las células agotar el nitrógeno de manera natural, mientras que el semicontinuo consiste en la reposición de cultivo fresco durante intervalos constantes de tiempo, promoviendo así la acumulación de lípidos.

Feng Yujie *et al* (2011) por su parte, desarrollaron y evaluaron la capacidad de la *Chlorella vulgaris* en la acumulación de lípidos en un medio de agua residual sintético, en sistemas por lote y semicontinuo. El cultivo por lote se llevó a cabo por 14 días, mientras que en el cultivo semicontinuo se realizaron reposiciones de medio fresco de 0.5 l, 1.0 l y 1.5 l, esto después del cuarto día de un sistema por lote. Los resultados de este estudio mostraron que el mayor contenido en lípidos (42%) se logró en el cultivo semicontinuo con el reemplazo diario de 1.0 l, mientras que el máximo contenido de lípidos alcanzados por un sistema por lote fue 37%, sin presentar cambios significativos desde el inicio hasta el final de la fase estacionaria. Sin embargo, la densidad celular fue superior en el sistema por lote con un máximo de 1.72 gl⁻¹, en contraste con la

máxima densidad celular de 0.89 g l^{-1} presentes en el semicontinuo con remplazo diario de 0.5 l.

Por otra parte Hsieh y Wu (2009) cultivaron *Chlorella sp.* en diferentes concentraciones de urea 0.025, 0.050, 0.100, 0.150 y 0.200 g l^{-1} como fuente de nitrógeno orgánico, en sistemas por lote, observaron que la ausencia o presencia de urea promueve un comportamiento distinto en las células en cuanto al crecimiento y acumulación de lípidos. Después de 6 días de cultivo, el medio con urea inicial de 0.200 g l^{-1} presentó la mayor concentración de biomasa (2.027 g l^{-1}), mientras que la menor concentración de biomasa se observó en el medio con urea inicial de 0.025 g l^{-1} (0.464 g l^{-1}). En los datos experimentales un aumento en la concentración de urea llevo a una disminución en el contenido de lípidos, de esta manera, la concentración de urea inicial de 0.200 g l^{-1} mostró 33% (menor acumulación de lípidos).

Por lo tanto, a medida que disminuye la concentración de urea aumenta la concentración intracelular de lípidos, de esta manera la concentración con urea inicial de 0.025 g l^{-1} registró el mayor contenido de lípidos (66%). La mejor concentración de urea en el cultivo por lotes fue 0.100 g l^{-1} ya que a esta concentración presenta una alta tasa de crecimiento (0.0576 h^{-1}) y alto contenido de lípidos totales (55%). En este mismo estudio un sistema semicontinuo de cuatro ciclos se llevo a cabo tomando la concentración inicial de urea de 0.025 g l^{-1} , aumentando el 26.4% de lípidos en comparación del sistema por lotes. La acumulación de lípidos en especies oleaginosas, a pesar de la atenuación de la división celular, es consecuencia de la asimilación continua de carbono y su orientación hacia la síntesis activa de ácidos grasos. Los lípidos bajo tales circunstancias, fungen como una reserva de carbono y energía, además de proteger al organismo contra el estrés fotooxidativo (Hernández *et al.*, 2009).

Las características de crecimiento y la composición de las microalgas dependen en gran medida de las condiciones de cultivo, así como de su metabolismo. Las microalgas presentan cuatro tipos de metabolismos: autótrofas, heterótrofas, mixotrofico y fotoheterotrófico (Chen *et al.*, 2011). Algunas especies de microalgas

tienen diferencias en su organización celular y distintos modos de crecimiento, de esta manera presentan la capacidad de manipular su metabolismo a través de simples cambios en las propiedades químicas del medio de cultivo. *Chlorella protothecoides* es una microalga que puede ser cultivada en condiciones heterotróficas o autótrofa. En un estudio Miao y Wu (2004), cultivaron de *Chlorella protothecoides* en condiciones heterotróficas suplementadas con glucosa y en condiciones limitantes de nitrato, sus resultados muestran un aumento en la concentración de lípidos 3.8 veces más en condiciones heterótroficas (55.2%) que en condiciones autótrofas (14.57%). No obstante, el contenido de proteínas fue superior en condiciones autótrofas (52.64%) que en condiciones heterótroficas (10.28%), en cuanto a los carbohidratos en ambas condiciones de crecimiento no presentaron diferencias significativas registrando un contenido de 10.62% en condiciones autótrofas y 15.43% en condiciones heterótroficas.

El rendimiento global de biodiesel a partir de microalgas no solo depende del contenido de lípidos que logre acumular la célula, también depende de la concentración de biomasa que se logre producir durante el cultivo (productividad de biomasa). En general, la productividad de biomasa y el contenido de lípidos están inversamente correlacionados entre sí, y condiciones de estrés como la privación de nitrógeno (o fósforo, en menor medida) limita el crecimiento de las células al tiempo que aumenta el contenido de lípidos.

Cuando el medio es modificado para estimular la síntesis de lípidos, la composición bioquímica de la célula también se ve afectada. Lv *et al* (2010) estudiaron el comportamiento de la composición bioquímica de *Chlorella vulgaris* (lípidos, proteínas y carbohidratos), evaluados en un sistema por lote, con 1% de CO₂ y 1.0 mM de KNO₃. Sus resultados muestran que tanto el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos se vio afectado por la fase de crecimiento. El contenido de proteína aumentó durante la fase de crecimiento exponencial, mientras que los carbohidratos, disminuyeron durante la fase estacionaria de 70 a 7 %, mientras que el contenido de carbohidratos aumentó de 13 a 70 % y los lípidos de 14 a 28 %. Al inicio de la inoculación, se observó una disminución de los componentes de reserva (carbohidratos y lípidos), y que todo el

carbono proveniente de la fotosíntesis es utilizado para que se lleve a cabo la síntesis de proteína.

Valenzuela-Espinoza *et al.* (2002) presentaron un fenómeno similar, al obtener los máximos valores de proteína durante la fase de crecimiento exponencial de *Isochrysis galbana* cultivada en dos medios distintos: un medio a base de fertilizantes agrícolas y el medio f/2, mientras que el contenido de carbohidratos y lípidos disminuyó durante esta fase, aumentando su contenido durante la fase estacionaria,

Otra especie comparada en un medio de fertilizante agrícola y f/2 fue *Rhodomonas sp.*, con el fin de observar la manera en que se modifica su crecimiento y la composición bioquímica durante 7 días. El crecimiento fue similar en ambos medios con una duración de crecimiento exponencial de 4 días, alcanzando su densidad celular al séptimo día con 1.33×10^6 y 1.43×10^6 cel ml⁻¹ en el medio f/2 y con fertilizantes agrícolas, respectivamente. En cuanto al contenido de proteínas se observaron sus valores máximos de 19.1 y 16.9 pg celula⁻¹ en el medio f/2 y con fertilizantes, respectivamente, registrados durante la fase de crecimiento exponencial, disminuyendo sus valores en las fases posteriores. El contenido de carbohidratos mostró una tendencia similar entre tratamientos respecto al tiempo de cultivo, durante la fase de crecimiento exponencial los carbohidratos disminuyeron de 38.6 a 10.4 pg celula⁻¹ en el medio f/2 y de 34.7 y 9.1 pg celula⁻¹ en el medio con fertilizantes, incrementando nuevamente, hasta valores de 28 y 23.3 pg celula⁻¹ en el medio f/2 y en el medio con fertilizantes, respectivamente, durante la fase estacionaria. El comportamiento de los lípidos, mostraron un comportamiento similar al de los carbohidratos, al disminuir sus valores en fase exponencial hasta 6.8 pg celula⁻¹ en el medio f/2 y aumentando a 13.7 pg celula⁻¹ durante la fase estacionaria. Mientras que en el medio de cultivo con fertilizantes, a partir del segundo día se mantuvo constante, reportando un valor de 13.3 pg celula⁻¹, concluyendo que la composición bioquímica está relacionada con la fase de crecimiento del cultivo o con el medio de cultivo (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2005).

Por otra parte Bulut *et al* (2011) cultivaron *Chlorella vulgaris* en medios de cultivo con deficiencias de nitrógeno y fosforo con el fin de evaluar el contenido de lípidos, proteínas y en la concentración de biomasa. El efecto de las deficiencias del 50% N, 100% N, 50% N mas 50% P y 50% P, respecto al control (medio Jaworsky). Demostraron que mientras que el nitrógeno es deficiente en el medio, el contenido de proteínas decrece en general. En este estudio, el contenido de proteína disminuyó debido a la carencia de nitrógeno presentes en los medios registrando un 20.3% en 50% N(-), 13.3% en 100%N(-), 21.37 en 50%N(-)50%P(-) y 38.16 en 50%P(-). Mientras que la concentración de lípidos en los medios que carecen de nitrógeno, se observó un aumento en el contenido de lípidos encontrando la mayor concentración de lípidos de 35.6% en el medio que carecía el 100% de nitrógeno con una concentración de biomasa de 0.18 g l⁻¹. De esta manera, mientras que el contenido de proteína disminuyó, el nivel de los lípidos aumentó considerablemente en los medios que carecían de nitrógeno.

La temperatura por su parte afecta notablemente el perfil lipidico de las microalgas, Li *et al* (2011) estudiaron el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la acumulación de lípidos de la microalga *Scenedesmus sp.* LX1, concluyeron que esta especie puede crecer en un amplio rango de temperatura (10~30 °C), la temperatura optima para producir la mayor concentración de lípidos y biomasa fue de 20 °C. Bajo esta condición, después de 15 días en un cultivo por lote la productividad de biomasa fue de 313.3 g (gP)⁻¹ mientras que la de lípidos fue de 112 g (gP)⁻¹. Por lo tanto a medida de que disminuye la temperatura se produce un aumento en los ácidos grasos no saturados, incrementando el grado de insaturación. Del mismo modo, cuando la temperatura aumenta se produce un aumento de ácidos grasos saturados. La temperatura ha demostrado que afecta el contenido de lípidos totales en las microalgas. Sin embargo, no existe una tendencia general y no se ha demostrado hasta el momento. Otro estudio demostró que las microalgas *Nannochloropsis oculata* y *Chlorella vulgaris* fueron fuertemente influenciadas por la temperatura, por lo tanto, un aumento de la temperatura de 20 a 25 °C prácticamente duplico el contenido de lípidos de *N. oculata* (7.90 a 14.92%), mientras que un aumento de 25 a 30 °C produjo una

disminución en el contenido de lípidos de *C. vulgaris* de 14.71 a 5.90 % (Converti *et al.*, 2009).

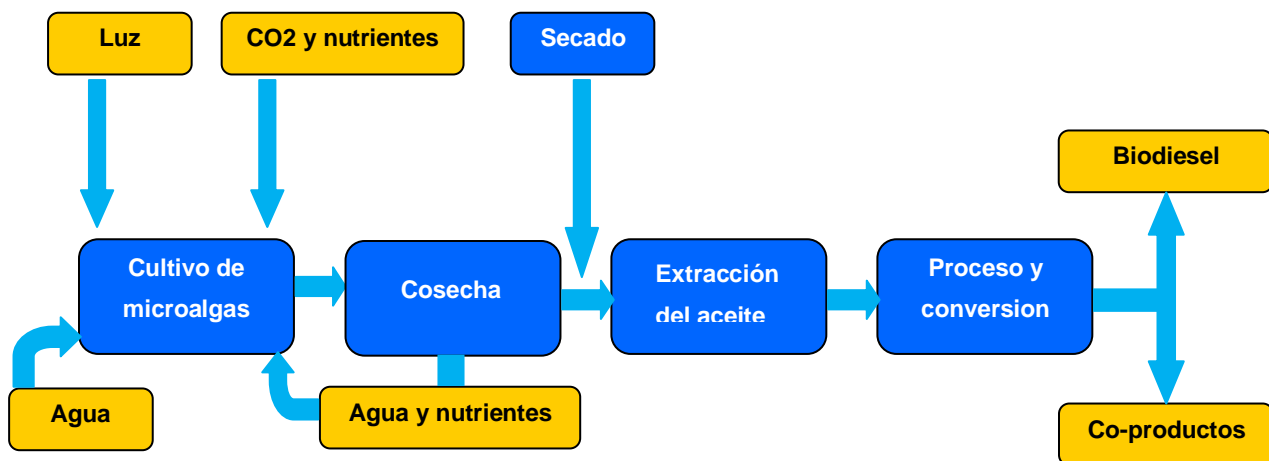
Otros factores como la concentración de CO₂ y la intensidad de la luz, desempeñan un papel importante en la síntesis y acumulación de lípidos, así como también en el crecimiento celular. Hsueh *et al.* (2009) reportaron que un incremento en la concentración de CO₂ de 0.04 a 8% en los cultivos de *Chlorella vulgaris*, aumentó tanto el contenido de lípidos como la concentración de biomasa, sin embargo, a concentraciones superiores al 10 % tanto, ambos parámetros disminuyeron. La máxima tasa de crecimiento (1.6 d⁻¹) se registró en 5% y 8% de CO₂.

Por otra parte Chiu *et al* (2009) estudiaron los efectos de la concentración de CO₂ en la producción de biomasa y la acumulación de lípidos en la *Nannochloropsis oculata*. Los resultados muestran que la acumulación de lípidos se incrementó de la fase logarítmica a la fase estacionaria pasando de 30.8% al 50.4% de lípidos en los cultivos aireados con un 2%, 5%, 10% y 15% de CO₂. La biomasa y la productividad máxima de lípidos fueron 0.480 y 0.142 gl⁻¹d⁻¹ con una condición del 2% de CO₂.

2.6. Producción de biodiesel a partir de microalgas

La producción de biodiesel a partir de microalgas es un proceso conformado en términos generales, por las etapas elementales de producción de biomasa rica en lípidos, recuperación o cosecha de la biomasa, extracción de lípidos y la transformación del aceite a biodiesel por medio de la reacción de transesterificación, como se indica en la figura 2 (Lee *et al.*, 2010). El agua y los nutrientes residuales pueden ser recuperados para darles un uso posterior, como fertilizantes, alimento para ganado, extracción de co-productos de alto valor comercial, (Chisti, 2008).

Figura 2. Representación esquemática de la producción de biodiesel a partir de aceite de microalga



Para la producción de biodiesel de microalgas se requieren grandes cantidades de biomasa. Para minimizar los gastos, la biomasa debe producirse mediante la luz solar disponible, siendo afectadas por las fluctuaciones diarias y variaciones estacionales en los niveles de luz. Las microalgas se pueden cultivar a gran escala en diferentes diseños (Chisti, 2008). La producción de microalgas puede utilizar el CO₂ de desecho que liberan las plantas de energía para la quema de combustibles fósiles.

- Selección de la especie de microalga.

La selección de la especie, es el primer paso antes de iniciar con el desarrollo de un proceso de microalgas, por lo tanto elegir la especie adecuada es un factor importante en el éxito global para la producción de biocombustibles a partir de microalgas (Li *et al.*, 2010; Griffiths, Harrison, 2009), esto representa una tarea rigurosa debido a la gran cantidad de especies disponibles.

La cepa ideal para la producción de biocombustibles debe presentar las siguientes características: (1) tener una alta productividad en lípidos, (2) tener una alta capacidad de absorción del CO₂, (3) capaz de sobrevivir a las altas tensiones tangenciales

comunes en los fotobiorreactores, (4) ser capaz de dominar las cepas silvestres en los sistemas de producción de estanques abiertos, (5) crecer en condiciones limitadas de nutrientes, (6) ser tolerantes a una amplia gama de temperaturas resultantes del ciclo diurno y variaciones estacionales, (7) generación de co-productos valiosos, (8) alta productividad en biomasa, (9) que tengan una alta eficiencia fotosintética, (10) que presenten características de auto-floculación. Por el momento, ninguna cepa de las conocidas actualmente es capaz de cumplir estos requisitos al mismo tiempo (Liam, Philip, 2010). Las especies nativas o autóctonas juegan un papel muy importante en la selección de especies óptimas, ya que son más resistentes a las condiciones ambientales locales, haciéndolas crecer con éxito. Otra cuestión es la modificación genética de microalgas, con esto se lograría aumentar significativamente el contenido de lípidos, actualmente hay poca aceptación social y política, lo cual limita su desarrollo (Oltra, 2011; Singh *et al.*, 2011).

- Cultivo de microalgas

Hay dos sistemas comúnmente utilizados para el cultivo de microalgas, se trata de sistemas abiertos como los estanques y los sistemas cerrados como los fotobiorreactores. La viabilidad de cada sistema depende de las propiedades de la microalga seleccionada, así como las condiciones climáticas y los costos de la tierra y agua (Liam, Philip, 2010 Rawat *et al.*, 2010).

- Estanques abiertos

Estos sistemas pueden ser categorizados en sistemas naturales (lagos, lagunas, estanques, mar) y sistemas artificiales o contenedores (Mata *et al.*, 2010). Estos sistemas es el método más barato para producción de biomasa a gran escala. El Raceway es el sistema artificial más utilizado.

Estos sistemas son relativamente baratos, son fáciles de limpiar, bajos insumos energéticos, fácil mantenimiento. Sin embargo la productividad de su biomasa es pobre (perdidas por evaporación, cambios de temperatura), se limita a pocas especies de microalgas, los cultivos se contaminan fácilmente por otras algas o protozoos, están afectados por los ciclos diurnos y variaciones estacionales, mezcla ineficiente, deficiencias de CO₂, limitación de luz.

- Sistemas cerrados: fotobiorreactores

Los sistemas de producción basados en la tecnología de fotobiorreactores están diseñados para superar algunos de los principales problemas que se presentan en los sistemas abiertos. En estos sistemas la contaminación se reduce presentando en todo momento cultivos monoalgales asegurando una duración prolongada del cultivo, los costos de cosecha se reducen significativamente, los fotobiorreactores proporcionan un ambiente controlado en los parámetros de crecimiento esto permite alcanzar una mayor productividad, tomando en cuenta que la productividad es el indicador más importante para el éxito de este tipo de tecnología (Harun *et al.*, 2010). Sin embargo los costos de operación de los sistemas cerrados son sustancialmente más altos que los sistemas abiertos.

Existen diferentes diseños; fotobiorreactores de placa plana, fotobiorreactores tubulares y fotobiorreactor en columna (Mata *et al.*, 2010).

- Cosecha de la biomasa

Es una fase difícil de la producción de biomasa microalgal y representa el 20-30% de los costes totales de producción. Los procesos incluyen, filtración (Zhang *et al.*, 2010), sedimentación, centrifugación, floculación e inmovilización, alguno de los cuales requieren altas inversiones de energía (Chen *et al.*, 2011; Liam, Philip, 2010; Rawat *et al.*, 2010).

La selección de la tecnología de separación y/o recolección es crucial para la producción económica de la biomasa de microalgas y depende de las características de las microalgas, por ejemplo, tamaño, densidad celular, y el valor de los co-productos que se generarían.

- Secado de la biomasa

Como es bien sabido, las microalgas pueden presentar un 90% o más de su peso total en forma de agua. Antes de cualquier aplicación comercial, es preciso deshidratarlas y obtener biomasa seca. El método más antiguo y el más barato es el secado solar, que viene tradicionalmente siendo utilizado desde la antigüedad con las algas marinas. Pero el método más empleado, aunque más costoso es el de tambores de secado en caliente, en el cual el líquido que contienen las microalgas previamente concentrado es vertido sobre unos rodillos calentados artificialmente que van desecando paulatinamente la biomasa y la convierten en polvo fino. El secado por aspersión, es comúnmente utilizado para la extracción de productos de alto valor, pero esta técnica es relativamente costosa y pueden causar un deterioro significativo de algunos pigmentos de las microalgas. La liofilización es una técnica igual de costosa, especialmente para las operaciones a gran escala (Liam, Philip, 2010).

- Extracción del aceite

Una vez seca la biomasa, los triglicéridos y los ácidos grasos son extraídos de la biomasa antes de su conversión a biodiesel.

Se han aplicado numerosos métodos para la extracción de los lípidos de las microalgas, los más comunes son: extracción por solventes, ultrasonido, extracción por

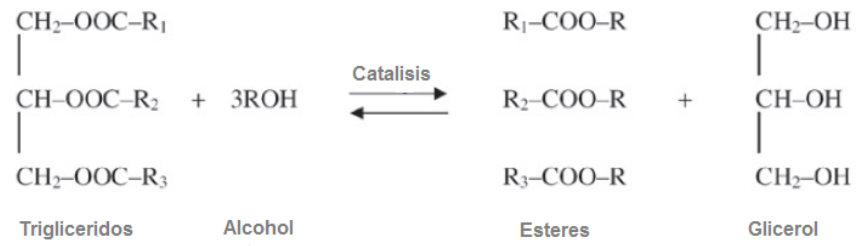
fluidos supercríticos y la prensa de aceite. El principal objetivo de estos métodos es destruir la pared celular de la microalga y extraer el aceite.

La extracción por solventes ha demostrado ser exitoso en el fin de extraer los lípidos de las microalgas. Los disolventes orgánicos como el benceno, ciclo hexano, acetona, cloroformo, se agregan a la biomasa seca. Otra técnica puede ser usada para la extracción del aceite de microalgas es a través de ultrasonido, este método expone a las microalgas a una onda de ultrasonidos de alta intensidad, lo que crea pequeñas burbujas de cavitación alrededor de las células, esta técnica solo ha sido utilizada a nivel laboratorio y la operación a escala comercial no está disponible (Harun *et al.*, 2010). La extracción supercrítica hace uso de altas presiones y temperaturas para romper las células. Este método en particular ha demostrado ser muy eficiente en cuanto al tiempo y se emplea comúnmente. La destrucción mecánica por medio de una prensa utiliza presión para romper las células y comprime todo hacia afuera. Aunque este método extrae casi el 75% del aceite no requiere de habilidades especiales, este método no es muy eficaz debido a que el tiempo de extracción es relativamente largo (Harun *et al.*, 2010).

- Producción de biodiesel

El aceite de microalgas es de alta viscosidad, lo que exige una conversión para la reducción de esta propiedad, la transesterificación un proceso en el cual los triglicéridos reaccionan con un alcohol en presencia de un catalizador ácido, alcalino o enzimático (Yusuf *et al.*, 2011; Rawat *et al.*, 2010). Los triglicéridos están estructurados por tres cadenas de ácidos grasos unidas a una molécula de glicerol (Figura 3). En el proceso, el glicerol es sustituido por el metanol dando lugar a la formación de ésteres metílicos de ácidos grasos denominado como biodiesel (Siddiquee, Rohani, 2011; Mutanda *et al.*, 2011; Harun *et al.*, 2010; Mohammad *et al.*, 2010).

Figura 3. Producción de biodiesel por reacción de transesterificación.



3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Inducir la acumulación de lípidos en las microalgas *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus dimorphus* cultivadas bajo diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo, evaluar el contenido de lípidos, proteínas, carbohidratos y producción de biomasa en las distintas fases de crecimiento.

3.2. Objetivos particulares

- Conocer y evaluar las variaciones del perfil bioquímico asociado a la producción de biomasa de *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella Sorokiniana* cultivadas a diferentes concentraciones de nitrógeno y fosforo.
- Determinar en qué fase de crecimiento celular existe mayor concentración de lípidos, proteínas y carbohidratos.

4. HIPOTESIS

La manipulación de la disponibilidad de nitrógeno y fósforo en medios sintéticos afectaría la síntesis, acumulación y relación de lípidos, proteínas y carbohidratos en las algas estudiadas en este trabajo, permitiendo por lo tanto inducir eventualmente la generación de lípidos para la posible utilización en biocombustibles.

5. JUSTIFICACION

En este siglo la humanidad afronta una grave problemática debido al aumento de la demanda energética mundial, agotamiento de los combustibles fósiles, incremento del precio de petróleo y las dificultades ambientales causadas por los gases de invernadero y su consecuencia: calentamiento global. Esta situación demanda urgentemente fuentes alternativas de energía con menores índices de contaminación, dentro de las cuales una opción viable es el desarrollo de biocombustibles a partir de microorganismos. Una alternativa energética promisoriosa que ha resultado muy atractiva en años recientes es el biodiesel.

El biodiesel se puede obtener de una gran variedad de fuentes, dentro de ellas, las microalgas han atraído un interés particular como una de las más prometedoras para la producción de biocombustibles debido a que su contenido de lípidos (1-70% peso seco), especialmente los triglicéridos, son el mejor sustrato para la producción de biodiesel y además es posible aumentar la síntesis y acumulación de grandes cantidades de lípidos mediante la optimización de los factores de crecimiento, lo cual se consigue induciendo condiciones de stress en la célula a través de estímulos físicos o químicos, manipulando las condiciones del cultivo, para mejorar la producción y concentración de lípidos para utilizarlos como materia prima para la producción de biodiesel. Factores como la temperatura, la radiación y mas notablemente la disponibilidad de nutrientes se ha demostrado que afecta tanto la composición y el contenido de lípidos de muchas microalgas (Hu, 2004; Hu *et al.*, 2008).

También se sabe que el nitrógeno y fósforo tienen una fuerte influencia en el metabolismo de lípidos en diferentes microalgas. Además estos macronutrientes son fácilmente manipulables y de bajo costo en comparación con otros factores.

Por ello la limitación de nitrógeno y fósforo es considerada la estrategia más eficiente para incrementar el contenido de lípidos en las microalgas (Lin, Lin, 2011).

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Selección de microalgas

Las cepas utilizadas en este estudio fueron *Scenedesmus dimorphus* (UTEX 1237) y *Chlorella sorokiniana*, especies que pertenecen al género *Chlorophyceae*, la especie *Scenedesmus dimorphus* fue obtenida de la colección de cepas de microalgas de la Universidad de Texas en Austin. La microalga se mantuvo en refrigeración a 4°C e iluminación artificial constante en tubos de ensayo en medio sólido Proteosa, mientras que la especie *Chlorella sorokiniana* fue aislada del sedimentador secundario de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Chihuahua, dicha especie se mantuvo en refrigeración a 4°C e iluminación artificial constante en tubos de ensayo en medio sólido modificado BG-11.

6.2. Preparación del inóculo y aclimatación en el laboratorio

6.2.1. Condiciones de crecimiento

A partir del medio sólido las microalgas fueron inoculadas en tubos de ensayo de 50 ml con 10 ml de medio, en un medio específico para el crecimiento de microalgas denominado BG-11 (modificado) que contiene los siguientes componentes: 1.5 g l⁻¹ NaNO₃, 0.04 g l⁻¹ K₂HPO₄, 0.036 g l⁻¹ CaCl₂·2H₂O, 0.075 g l⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 0.001 g l⁻¹ Na₂EDTA. El medio se ajustó inicialmente a pH 7 utilizando NaOH 1N y se esterilizó en una autoclave a 121 °C y 15 lbs in⁻² de presión por 20 minutos.

Se realizaron rutinas de transferencia (escalamientos) cada 4 días (curva de crecimiento previamente analizada) inoculando en el medio BG-11 con 10% (v/v) del cultivo en fase media-exponencial, manteniendo siempre una relación 1:10 (cultivo:medio) hasta alcanzar 3 litros de cultivo.

Ambas especies se mantuvieron en condiciones axénicas y monoespecífica para su aclimatación en el laboratorio, con iluminación continua con 4 lámparas de luz blanca fluorescente de 75 W (Osram número S028), a una temperatura de 22 ± 3 °C, mientras

que el pH se ajustó a 7 antes de la inoculación. Para minimizar la sedimentación de células, los cultivos fueron agitados manualmente dos veces al día.

6.3. Cultivo de microalgas

Para inducir la síntesis de lípidos y someter a las microalga a un estrés nutricional, fueron cultivadas en tratamientos que contenían diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo. Los tratamientos simularon un medio residual artificial, modificado al descrito por De Bashan *et al* (2002). Para tal fin, se utilizó NH_4Cl (J.T Baker Chemicals) como fuente de nitrógeno y KH_2PO_4 (Sigma) como fuente de fósforo, manteniendo una relación 5:1 molar, relación encontrada en un agua residual doméstica (Haydar S., Aziz J.A., 2009).

Los tratamientos para *Scenedesmus dimorphus* se identificaron como S1, S2, S3, S4 y fueron producto de un diseño de tratamiento factorial 2 x 2 (dos factores, dos niveles cada uno). El factor A corresponde a la concentración de nitrógeno con dos niveles (alto-bajo), mientras que el factor B a la concentración de fósforo también con dos niveles (alto-bajo), mediante un diseño experimental completamente al azar.

Los tratamientos para *Chlorella sorokiniana* se identificaron como C1 y C2, a diferencia de los cultivos de *Scenedesmus dimorphus*, con esta microalga solamente se estudiaron los efectos con concentraciones bajas de nitrógeno/fósforo y concentraciones altas de nitrógeno/fósforo sin realizar un diseño factorial. La nomenclatura de los tratamientos utilizada se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Nomenclatura y tratamientos empleados para los cultivos de *Scenedemus dimorphus*

Tratamiento	Tratamiento	N/P	gr-N l ⁻¹	g-P L ⁻¹
<i>S. dimorphus</i>	<i>C. sorokiniana</i>			
S1	C1	bajo/bajo	0.01	0.005
S2		bajo/alto	0.01	0.053
S3		alto/bajo	0.12	0.005
S4	C2	alto/alto	0.12	0.053
SC	CC	0	0	0
SN	CN	Nutrición normal	0.25	0.007

A manera de control se utilizó un medio de cultivo, sin nitrógeno ni fósforo, al igual que un medio rico en nutrientes y nutrición normal, dicho medio se conoce como BG-11 y fue modificado para este estudio (anteriormente descrito).

6.3.1. Condiciones de crecimiento

Una vez aclimatadas las microalgas en el medio BG-11 modificado, las células fueron cosechadas por centrifugación (centrífuga refrigerada Sorval RC5B plus) a 3000 rpm por 15 minutos, las células fueron lavadas con agua destilada para eliminar los excedentes de sales inorgánicas. Las condiciones de los cultivos fueron: sistema estático o por lote (batch en inglés), la temperatura se mantuvo a 24 ± 2 °C, mientras que la iluminación fue continua y fue suministrada mediante 4 lámparas de luz blanca fluorescente de 75 W (Osram número S028), el fotoperiodo fue de 24/0 (luz/obscuridad), a cada cultivo antes de la esterilización se le añadió un amortiguador de pH para minimizar su efecto y fue ajustado a 7 con HCl concentrado, fue

monitoreado diariamente durante el periodo de tratamiento mediante el método colorimétrico de rojo fenol (descrito en una sección posterior).

Ambos experimentos se llevaron a cabo por duplicado durante 15 días y se tomaron muestras cada 72 horas para el análisis de su biomasa. El conteo celular se monitoreó diariamente tomando la muestra de manera aleatoria.

Para la preparación de los medios de cultivo se uso agua destilada que se colocó en unos recipientes de vidrio de 4 litros con un volumen de operación de 3 litros, el medio residual artificial estuvo compuesto de los siguientes componentes: $0.025 \text{ g l}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.075 \text{ g l}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.025 \text{ g l}^{-1} \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.001 \text{ g l}^{-1} \text{ Na}_2\text{EDTA}$. Los metales traza y vitaminas se agregaron en referencia a las concentraciones descritas del medio f/2 por Guillard y Ryther (1962), mientras que las concentraciones de nitrógeno y fosforo se agregaron como lo indica la tabla 6.

Los medios de cultivo se colocaron en los recipientes de vidrio (fotobioreactores) inmediatamente después se esterilizó en un autoclave (Marketforge Sterilmatic) a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ y 15 lbs in^{-2} de presión por 20 minutos, previo a la esterilización se colocó para cada fotobioreactor 2.42 g l^{-1} de amortiguador trizma-basel calibrado a pH 7 con HCl concentrado. Una vez que el medio alcanzó la temperatura ambiente, los compuestos de nitrógeno y fosforo fueron esterilizados por filtración, así como también, los metales traza y vitaminas, procedimiento que se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar (Pharmasafe modelo 300). Los cultivos fueron colocados de manera aleatoria y a una distancia de 20 cm de la luz para evitar el sobre calentamiento de los cultivos.

6.3.2. Diseño del fotobioreactor

Los fotobioreactores consistieron en recipientes de vidrio de 4 litros con un volumen de operación de 3 litros y fue cerrado con un tapón de goma horadado con tres orificios. A los cuales se le ajustaron tres varillas de vidrio, la primera, sirvió para proporcionarle agitación al medio a través de aire estéril y fue ubicada a dos centímetros de la base

del recipiente, el aire se suministro a través de una bomba (2 l min^{-1}) adaptada con un filtro de fibra de vidrio de $0.2 \mu\text{m}$ (Whatman) y manguera de vinilo. La segunda varilla, sirvió para el escape de aire y gases generados por el cultivo, ubicada a 3 cm debajo del tapón, a dicha varilla se le adaptó un filtro de fibra de vidrio $0.2 \mu\text{m}$ para evitar la contaminación del cultivo . La última varilla sirvió como toma de muestreo y fue ubicada a la mitad del recipiente, (Fig. 4).

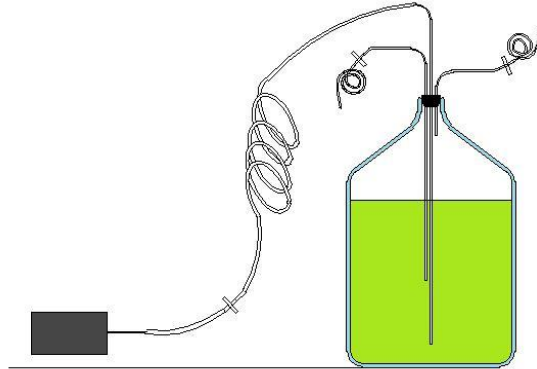


Figura 4. Esquema de Fotobioreactor empleado en los cultivos *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella sorokiniana*

6.4. Seguimiento de los cultivos

Después de la inoculación, se dio el seguimiento a la cinética de crecimiento y obtención de muestras para la determinación de la densidad celular y composición química. Procedimiento que se describe a continuación

6.4.1. Crecimiento algal

Durante el periodo de tratamiento, con ambas microalgas se realizaron registros de la concentración celular (cel ml^{-1}) y determinación de biomasa por peso seco (g l^{-1}).

Para estimar la densidad microalga en cada cultivo, se realizaron conteos celulares de cada muestra por duplicado utilizando una cámara de Neubauer de 0.1 mm. Se tomaron 2 ml de cultivo homogéneo cada 24 horas.

También, fue estimada indirectamente a través de la densidad óptica del cultivo. Con lo cual se midió la absorbancia de una muestra del cultivo a una longitud de onda de 680 nm en un espectrofotómetro HACH DR/2800. El número de células de ambas microalgas, fueron calibradas contra la absorbancia, dicho en otras palabras, el número de células y la absorbancia están linealmente correlacionadas. Siendo así, la concentración celular para *Scenedesmus dimorphus* puede ser expresada como $y = 7.936x - 0.166$; $R^2 = 0.999$, mientras que para *Chlorella sorokiniana*: $y = 31.74x - 2.3567$; $R^2 = 0.996$ (y : concentración celular; x : absorbancia a 680 nm).

La tasa de crecimiento (μ) para ambas especies, fue determinada en todas las fases de crecimiento del cultivo, mediante la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\ln(X_2 / X_1)}{\ln 2(t_2 - t_1)}$$

Donde X_2 representa el número de células en el tiempo t_2 y X_1 representa el número de células en el tiempo t_1 .

6.4.1.1. Cuantificación de biomasa

Para la determinación de biomasa, 20 ml de cultivo homogéneo por triplicado fueron concentrados en filtros de fibra de vidrio GF/F (25 mm de diámetro) previamente lavados con agua destilada e incinerados a 300°C por 24 horas, hasta llegar a peso constante, posteriormente, la muestra filtrada se lavó con 10 ml de agua destilada y fueron guardados en sobres de papel aluminio. Después de la filtración, los sobres

(entreabiertos) con las muestras fueron colocados nuevamente en la estufa a 60 °C durante 12 horas y colocados en un desecador por 2 horas. Después de esto, los filtros fueron pesados en una balanza (Sartorius CP224S; $\pm 0.1\text{mg}$), y devueltos a la estufa, esta operación se repitió hasta que se logró el peso constante. La cuantificación se realizó por diferencia de peso del filtro vacío y el filtro con muestra.

Las muestras para la determinación de biomasa por peso seco (g l^{-1}), se fueron cosechando a lo largo de la curva de crecimiento (días 0, 3, 6, 9, 12 y 15).

6.4.2. Composición química de la biomasa

Para la determinación de lípidos, carbohidratos y proteínas 180 ml de cultivo fue cosechado por centrifugación a 3000 rpm por 15 minutos bajo condiciones estériles en las diferentes fases de crecimiento (día 0, 3, 6, 9, 12 y 15). La biomasa fue lavada dos veces con agua destilada con el fin de eliminar las sales inorgánicas excedentes y concentrada en tubos de plástico (falcon: corning) inmediatamente después la biomasa fue liofilizada por 12 horas en una liofilizadora LABCONCO Lyph-lock, después de esto las muestras fueron almacenadas en tubos de plástico a -20 °C en un ultra congelador (Revco), para su análisis posterior. Los tubos fueron sellados con papel parafinado para evitar que la biomasa tome humedad.

6.4.2.1. Extracción de lípidos totales

La determinación de lípidos se llevó a cabo por el método de Bligh y Dyer (1959) adaptado para la extracción de lípidos de microalgas (Arredondo V., Voltolina D., 2007). Se pesó entre 5 y 50 mg de microalgas liofilizadas en un tubo de vidrio de 5 ml por triplicado y se adicionaron 3 ml de una mezcla de cloroformo:metanol (1:2, v/v), esta suspensión celular se sonicó por medio de un disruptor ultrasónico de células (Microson convetor ultrasonic 962) por tres ciclos de 15 minutos en un baño con hielo, para posteriormente incubar los tubos al menos 24 horas a 4°C envueltos en papel

aluminio para protegerlos de la luz, de esta manera se favoreció la extracción completa de los lípidos. Después de este tiempo, las muestras se sonicaron nuevamente por otros tres ciclos de 15 minutos en un baño de hielo y se centrifugaron a 3000 rpm por 20 minutos a 5°C. La pastilla celular se lavo dos veces con 1.5 ml de la mezcla de solventes, una vez recuperado el extracto se agregaron 2 ml de agua destilada para romper el equilibrio entre el cloroformo:metanol, formándose dos fases, cloroformo:lípido (inferior) la cual se recuperó con ayuda de una pipeta pasteur, la fase metanol:agua (superior) se lavó con 1 ml de cloroformo y se centrifugo nuevamente, la fase metanol:agua se desechó. Las extracciones cloroformo:lípido se juntaron en un tubo de 5 ml previamente pesado y llevado a peso constante. Los lípidos recuperados en la fase clorofórmica se llevaron a sequedad en una atmósfera con gas nitrógeno.

6.4.2.1.1. Cuantificación de lípidos totales

La cuantificación de lípidos se llevó a cabo por métodos gravimétricos, en el cual el extracto lipidico en cloroformo que se recuperó en tubos previamente pesados y a peso constante; posteriormente después de que se secó con nitrógeno gaseoso, se colocó en un desecador y por diferencia de peso se cuantificó el porcentaje de lípidos mediante la siguiente ecuación:

$$\% L_{TOTAL} = \frac{PTL - PTV}{W} \cdot 100$$

Donde: *PTL*: peso del tubo con lípidos (mg); *PTV*: peso del tubo vacío (mg) y *W*: peso de la muestra (mg).

6.4.2.1.2. Monitoreo del contenido lipídico

Para observar el comportamiento de los lípidos neutros en los cultivos de *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus dimorphus* cultivadas bajo diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo; se utilizó una solución de rojo nilo (Lee, 1998) descrita a continuación: para cada tratamiento se tomó 1×10^6 cel ml^{-1} en las diferentes fases de crecimiento (día 0, 3, 6, 9, 12 y 15) por triplicado y se colocaron en un tubo eppendorf, el pellet se resuspendió en 1 ml de buffer de fosfatos (PBS), inmediatamente después se les agregó 12 μl de solución Rojo nilo ($250 \mu\text{g ml}^{-1}$ en acetona), se agitó cuidadosamente de manera manual para que todas las células quedaran expuestas al colorante, posteriormente, las células fueron incubadas 20 minutos en ausencia de luz (tapados con papel aluminio), después del periodo de incubación las células fueron centrifugadas a 10000 rpm por 1 minuto (microcentrifuga eppendorf 5417R) y lavadas con 1 ml de PBS. Por último los lípidos neutros celulares fueron cuantificados por medio de la fluorescencia de las células teñidas con rojo nilo en un espectrofotómetro ND-1000 (Nano Drop), utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm y emisión de 576 nm.

La solución de rojo nilo se mantuvo en un frasco color ámbar y se almacenó en la oscuridad a 4 °C.

6.4.2.2. Análisis de Proteínas totales

Las proteínas se determinaron por el método Kjeldahl, el cual consistió en pesar de entre 5 a 20 mg de biomasa liofilizada y se colocó en un matraz Kjeldahl, dichas muestras fueron digeridas con 2 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado y catalizadas con aproximadamente 0.5 gramos de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Posteriormente las muestras fueron sometidas a digestión en una parrilla múltiple (digestor microkjeldahl), bajo una campana de extracción, con los matraces ligeramente inclinados usando bajas temperaturas al inicio y aumentando la temperatura a medida que procedió la digestión, rotando los matraces de vez en

cuando para asegurarse de que se digiera toda la muestra. La digestión finalizó cuando el color de la muestra fue azul-verde y de aspecto cristalino. La muestra se pasó a un matraz de 10 ml y se aforó a este volumen.

Por otro lado, en un matraz erlenmeyer de 250 ml se colocaron 10 ml de ácido bórico saturado al 4% (H_3BO_3) al cual se le adicionó de 3 a 4 gotas de indicador, la solución viró a un color violeta, el matraz se colocó en el tubo colector del condensador, quedando sumergido en la solución de ácido bórico, inmediatamente después, se colocó 2.5 ml de la muestra digerida se hizo pasar a la cámara de ebullición del destilador y fue neutralizada con una 5 ml de hidróxido de sodio al 40% (NaOH), después de que se reunieron las soluciones se cerró la llave de paso y se procedió a la destilación. Una vez iniciada la destilación por arrastre de vapor, se colectó el destilado en el matraz el cual cambio de violeta a verde. La solución recuperada fue titulada con ácido clorhídrico 0.01 N (HCl), un color violeta indicó el punto final de la titulación, posteriormente se anotaron los mililitros consumidos por el titulante (HCl).

Cada equivalente del HCl usado corresponde a un equivalente de NH_3 o a un equivalente de N en la muestra original. Por lo tanto el porcentaje de proteína se determinó a partir de las siguientes ecuaciones

$$\% N_{TOTAL} = \frac{V_{HCl} \cdot C \cdot 0.014}{W} \cdot 100$$

$$\% P_{TOTAL} = \% N_{TOTAL} \cdot 6.25$$

Donde: V_{HCl} representa el volumen de HCl gastados (ml); C : es la normalidad del ácido clorhídrico (0.01N); 0.014: es el miliequivalente del nitrógeno; W : es el peso de la muestra (gr); 6.25: factor utilizado para convertir nitrógeno a proteínas.

6.4.2.3. Análisis de Carbohidratos totales

Para la determinación de los carbohidratos se pesaron 5 mg de biomasa liofilizada por triplicado, se sometió a hidrólisis con 5 ml de H₂SO₄ 1 M en un termo baño a 100 °C durante una hora. Previo a la hidrólisis, la muestra de biomasa y el ácido se sonicaron durante 5 minutos.

Pasado el tiempo de hidrólisis y una vez enfriados los tubos a temperatura ambiente, del hidrolizado se tomó una alícuota y se siguió el método descrito por Dubois *et al.*, (1956). Dicho método usa ácido sulfúrico y fenol, que al reaccionar producen un color naranja. Después de la hidrólisis las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente y centrifugadas a 3000 rpm a 10 °C por 15 minutos, después se tomó una alícuota del extracto ácido y se le agregó 1 ml de fenol al 5% y 5 ml de H₂SO₄ concentrado. La mezcla produce una reacción exotérmica, por lo que es necesario que los tubos se enfríen a temperatura ambiente e inmediatamente después se procedió a leer las muestras a 485 nm en un espectrofotómetro de HACH DR/2800. Antes de proceder a la determinación todo el material utilizado se lavó con ácido clorhídrico al 10 % y enjuagado con suficiente agua destilada y fue secado en la estufa.

La cuantificación se realiza construyendo una curva de calibración con glucosa, la cual se obtuvo siguiendo las indicaciones descritas por las técnicas colorimétricas, usando un gradiente de concentración de glucosa anhidra a partir de una solución de 100 µg ml⁻¹, todas las diluciones se prepararon por triplicado, las lecturas de absorbancia se leyeron a 485 nm en un espectrofotómetro HACH modelo DR/2800.

Los cálculos de carbohidratos se realizaron a partir de la ecuación lineal resultante de la curva de calibración de carbohidratos, utilizando la concentración de glucosa como variable dependiente, la cual puede ser expresada como $y = 61.63x + 0.124$ (y: concentración de glucosa; x: absorbancia A_{485nm} ; $R^2 = 0.998$; $P < 0.05$). El porcentaje de carbohidratos fue obtenido mediante la siguiente ecuación:

$$\%C_{TOTAL} = \frac{(61.63 \cdot A_{485nm} + 0.124) \cdot Ve}{Vm \cdot Ps} \cdot 100$$

Donde: A_{485nm} valor de la absorbancia; V_e : volumen total del extracto ácido (ml);

V_m : corresponde al volumen de la alícuota a analizar (ml) y P_s : corresponde al peso seco de la muestra liofilizada (mg ml^{-1}), (Voltolina D., Arredondo V., 2007).

En la figura 5 se describe la secuencia del trabajo experimental para la presente investigación.

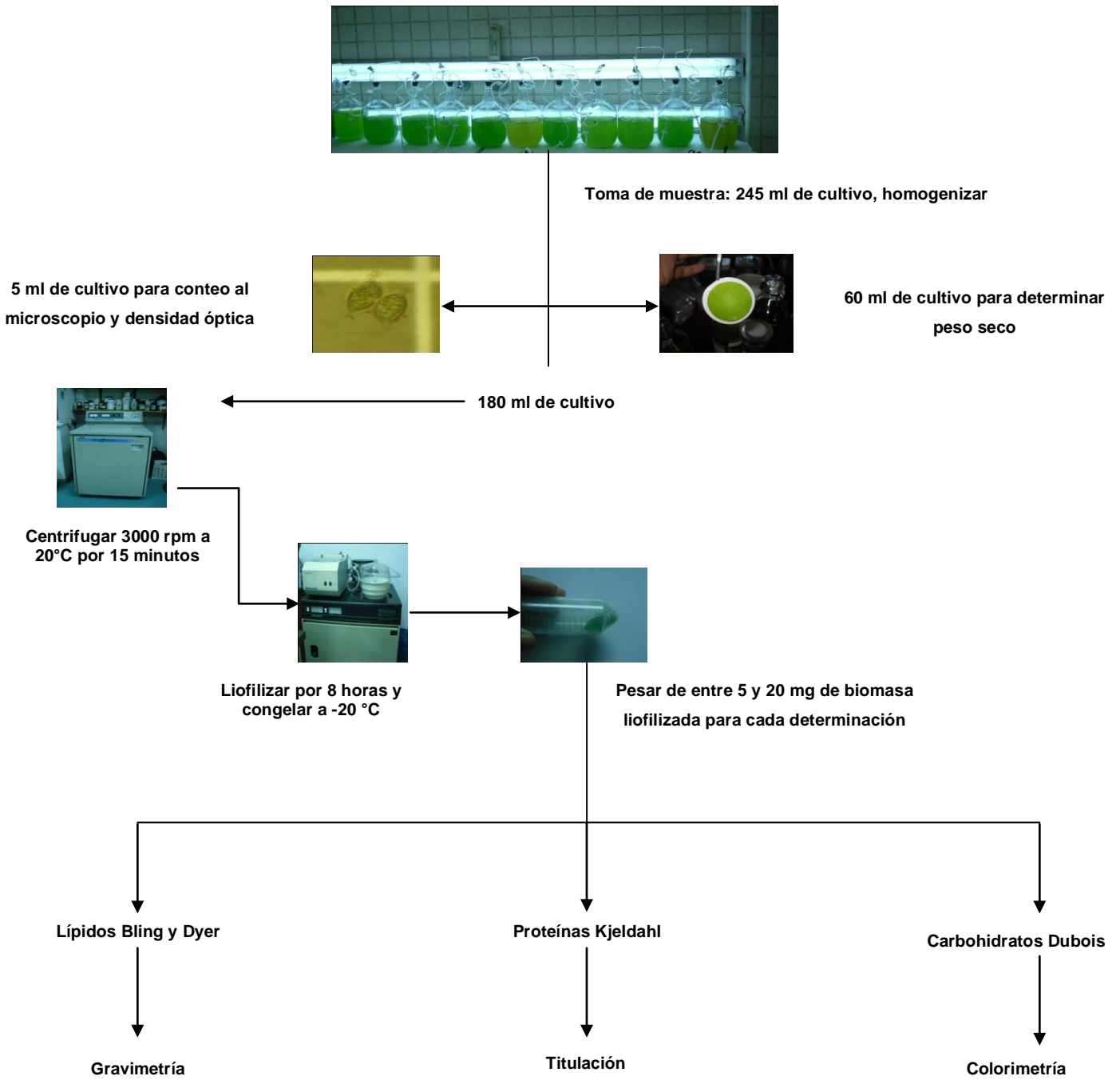


Figura 5. Diagrama de flujo del trabajo experimental: obtención de muestras para la determinación de la composición química de *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus dimorphus*.

6.5. Preparación de las soluciones estándar para la determinación colorimétrica de pH

Se prepararon 8 tubos estándar de 50 ml de agua destilada con 1 mg ml^{-1} de indicador rojo fenol, previamente ajustados a pHs de 6.4 a 8.2 con incrementos de 0.2 unidades de pH, con la ayuda de soluciones de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio y un potenciómetro previamente calibrado, la gama de colores fueron del amarillo (6.4) a rosa (8.2). Para la medición de los cultivos, diariamente se tomaron 990 μl de cultivo con 10 μl de la solución de rojo fenol y se comparó colorimétricamente con los tubos estándar, como los cultivos de estudio utilizaron un amortiguador de pH (trizma-base) y ajustado a 7, no se esperan muchas variaciones de pH.

6.6. Aislamiento y purificación de la microalga

La muestra fue tomada del sedimentador secundario de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Chihuahua, posteriormente dicha muestra fue centrifugada a 2000 rpm por 45-90 segundos, el sobrenadante se eliminó e inmediatamente después las células se resuspendieron en medio estéril BG-11 (modificado), después de esto, las células fueron incubadas durante 4 a 8 días. Los métodos que se utilizaron se describen a continuación:

6.6.1. Aislamiento en placas de agar

Se preparó el medio de cultivo BG-11 adicionando 20% de agar. Se esterilizó en autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ y 15 lb in^{-2} de presión durante 15 minutos. Posteriormente, se dejó a temperatura ambiente y antes de que solidifique se vació a cajas petri estériles de 10 cm. Inmediatamente después, se transfirieron una o dos gotas en las cajas con medio sólido, que se esparcieron con perlas de vidrio estériles. Las cajas se colocaron en un ambiente con temperatura y luz controlada; se incubaron durante 4 a 8 días y posteriormente se observaron en un microscopio invertido y/o estereoscopio y con la ayuda de un asa se seleccionaron las colonias libres de otros microorganismos, que se

trasfirieron a tubos que contenían medio sólido inclinados y se esparcieron con la ayuda de un asa bacteriológica. Esta tarea se realizó varias veces realizando resiembras clonales sucesivas, de esta manera se permitió purificar el cultivo, por tanto, la pureza fue garantizada por dichas resiembras y observación regular bajo el microscopio. Sin embargo para lograrlo con mayor seguridad esta técnica se combinó con la técnica de dilución seriada, que se describe a continuación.

6.6.2. Diluciones seriadas

Se tomó 1 ml del cultivo original y se agregó a en placas de pocillos múltiples con capacidad 2 ml (por pozo) y diluciones sucesivas de 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000. Las transferencias se fueron realizando y al mismo tiempo se observaron los resultados en un microscopio invertido (Olympus 1x70) y/o estereoscopio e incubadas en un ambiente con temperatura controlada (20 °C) y luz artificial constante.

Para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos se utilizaron varios antibióticos tales como cloranfenicol ($5 \mu\text{gr ml}^{-1}$), anfotericina (10 μl), gentamicina (5 μl),

Una vez que se obtuvo un cultivo axenico y monoespecífico, la microalgas se propagó para su posterior identificación y estudios.

7. RESULTADOS

7.1. Evaluación cuantitativa de los cultivos de *Scenedesmus dimorphus*

7.1.1. Crecimiento algal

Scenedesmus dimorphus UTEX 1237 fue cultivada en condiciones de estrés bajo diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo. Para cada cultivo se realizaron conteos diarios iniciando con una concentración celular de aproximadamente 1×10^6 células ml^{-1} para cada uno de los cultivos.

El pH y la temperatura son dos variables fundamentales durante el cultivo de microalgas por lo que estas se mantuvieron constantes entre 7-7.5 con un promedio de 7.2 ± 0.1 y 22.0 ± 3 °C.

El análisis de varianza (ANOVA) muestra que las concentraciones de nitrógeno y fósforo suministradas a los medios de cultivo afectaron el crecimiento celular de *Scenedesmus dimorphus*, observándose un efecto significativo de estas dos variables en la mayoría de los días ($p < 0.05$); no obstante, cuando todos los tratamientos estaban en fase de crecimiento exponencial (día 3) solamente la concentración de nitrógeno influyó significativamente en la densidad celular, además dicho análisis revela la existencia de una interacción entre el nitrógeno y fósforo en el momento en que todos los cultivos de encontraban en fase estacionaria (día 12). Por otro lado, la densidad celular se incrementó en mayor medida en aquellos tratamientos que contenían altas concentraciones ya sea de nitrógeno y/o fósforo (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de la concentración de nitrógeno y fósforo en el crecimiento celular de *Scenedesmus dimorphus* en diferentes fases de la curva de crecimiento en los tratamientos S1, S2, S3 y S4. I: día de inoculación; E: fase exponencial; ES: fase estacionaria; ET: fase estacionaria tardía. NS = no significativo; S = significativo ($\alpha = 5\%$).

	Día	Nitrógeno		Fósforo		Interacción	
		P-valor	P < 0.05	P-valor	P < 0.05	P-valor	P < 0.05
I	0	0.478	NS	0.478	NS	0.571	NS
E	3	0.045	S	0.220	NS	0.261	NS
ES	6	0.001	S	0.001	S	0.566	NS
ES	9	0.000	S	0.000	S	0.705	NS
ES	12	0.000	S	0.000	S	0.020	S
ET	15	0.000	S	0.002	S	0.093	NS

En la figura 6 se representan las curvas de crecimiento de *Scenedesmus dimorphus* a diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo, además del tratamiento SN y el SC. El valor promedio máximo de crecimiento celular para el tratamiento S1 fue de 7.25×10^6 células ml^{-1} valor observado al día 11. En cuanto a la tasa de crecimiento (μ), el máximo valor se presentó al primer día del cultivo (1.007 día^{-1}) y este fue descendiendo a medida de que la densidad celular disminuía hasta llegar a 0.009 día^{-1} (promedio a partir de fase estacionaria). El día en que mayor producción celular hubo fue al cuarto con 1.42×10^6 células $\text{ml}^{-1}\text{d}^{-1}$ (fase exponencial), el valor mínimo de producción encontrada fue al día 14 con un valor negativo de 0.57×10^6 células $\text{ml}^{-1}\text{d}^{-1}$ (fase de muerte). En lo que respecta al tratamiento S2, presentó un continuo incremento de su densidad celular, desde el inicio hasta el final de la fase exponencial, con valores promedio de 0.91 a 10.37×10^6 células ml^{-1} , el máximo valor promedio encontrado se presentó al doceavo día con 11.33×10^6 células ml^{-1} , mientras que a partir del día 14 se observó una disminución celular iniciando la fase de muerte llegando a valores de 9.43×10^6 células ml^{-1} al final del experimento. La máxima producción celular se encontró al

quinto día de haber iniciado el cultivo con un valor promedio de 2.60×10^6 células $\text{ml}^{-1}\text{d}^{-1}$, mientras que la mínima producción de células fue al día 14 con un valor negativo de 1.29×10^6 células $\text{ml}^{-1}\text{d}^{-1}$. La tasa de crecimiento (μ), por su parte, mostró su valor máximo de divisiones al primer día de cultivo con 1.54 dia^{-1} seguido por 0.55 dia^{-1} al cuarto día, y mostró su valor mínimo al día 14 con un valor negativo de 0.18 dia^{-1} . Por su parte, la densidad celular del tratamiento S3, incremento de 1.01 a 10.43×10^6 células ml^{-1} desde el día cero hasta el sexto día de cultivo (final de fase exponencial), mostrando ligeros aumentos no significativos, dando lugar al inicio de la fase estacionaria, llegando a una concentración de 11.44×10^6 células ml^{-1} al final del experimento. La máxima producción celular se presentó al sexto día de haber iniciado el cultivo con un valor de 2.48×10^6 células $\text{ml}^{-1}\text{d}^{-1}$, mientras que la menor producción celular fue al onceavo día con un valor negativo de 0.49×10^6 células $\text{ml}^{-1}\text{d}^{-1}$.

Por su parte la tasa de crecimiento (μ) presentó su valor máximo al primer día de cultivo con 1.23 dia^{-1} , mostrando una disminución a partir del sexto día de 0.39 a 0.01 dia^{-1} hasta el final del cultivo. De los tratamientos a los que se les modificó la concentración de nitrógeno y fósforo, S4 fue el que registró la máxima densidad celular, observando valores promedio máximo de 17.18×10^6 células ml^{-1} al día 14 de haber iniciado el cultivo, dicho aumento es comparable con las elevadas tasas de crecimiento registradas en este tratamiento, encontrando su valor máximo al primer día de iniciado el cultivo con un valor de 1.61 dia^{-1} , seguido por 0.81 dia^{-1} hallado al cuarto día, así como la elevada productividad celular encontrada también al cuarto día con un valor de 4.00×10^6 células $\text{ml}^{-1}\text{d}^{-1}$, mientras que la mínima producción celular se encontró al día 15 con un valor negativo de 0.24×10^6 células $\text{ml}^{-1}\text{d}^{-1}$.

El medio de nutrición normal (SN), presentó un crecimiento más acelerado que el resto de los tratamientos tal y como lo muestra la figura 6, registrando la máxima concentración celular al décimo día con un valor promedio de 39.80×10^6 células ml^{-1} , tiempo que duró su fase exponencial, por lo que a partir de este día la concentración celular disminuyó, dicho efecto también se observó en la tasa de crecimiento (μ), registrando valores mínimos en la fase estacionaria. Sin embargo, como era de

esperarse los máximos valores de crecimiento específico se presentaron durante la fase de crecimiento exponencial, con un valor máximo de 1.33 día^{-1} observado al cuarto día de haber iniciado el cultivo. Por su parte, la máxima producción celular se encontró al noveno día con un valor promedio de $7.76 \times 10^6 \text{ células ml}^{-1}\text{d}^{-1}$ seguido por el cuarto día con un valor de $6.36 \times 10^6 \text{ células ml}^{-1}\text{d}^{-1}$ registrando los mínimos valores después del décimo día cuando ya no se observó crecimiento alguno. Sin embargo en el tratamiento control (SC) al no contener los principales macronutrientes en el medio, su densidad celular fue baja comparada al resto de los tratamientos, por lo tanto su concentración celular aumentó ligeramente de 0.97 a $5.32 \times 10^6 \text{ células ml}^{-1}$ del día de la inoculación al sexto día de haber iniciado el cultivo. Después del sexto día, no mostró diferencias significativas en su crecimiento dando inicio a la fase estacionaria, llegando a un valor máximo al día 12 con $5.49 \times 10^6 \text{ células ml}^{-1}$, decayendo su concentración celular hasta $5.11 \times 10^6 \text{ células ml}^{-1}$ al final del cultivo. La producción diaria máxima se presentó al quinto día con $1.20 \times 10^6 \text{ células ml}^{-1}\text{d}^{-1}$, al igual que la concentración celular a partir de sexto día no se registró producción celular. La tasa de crecimiento específico (μ) presentó su valor máximo al primer día de haber iniciado el cultivo con un valor de 1.08 día^{-1} , mostrando un descenso al séptimo día donde ya no hubo división celular.

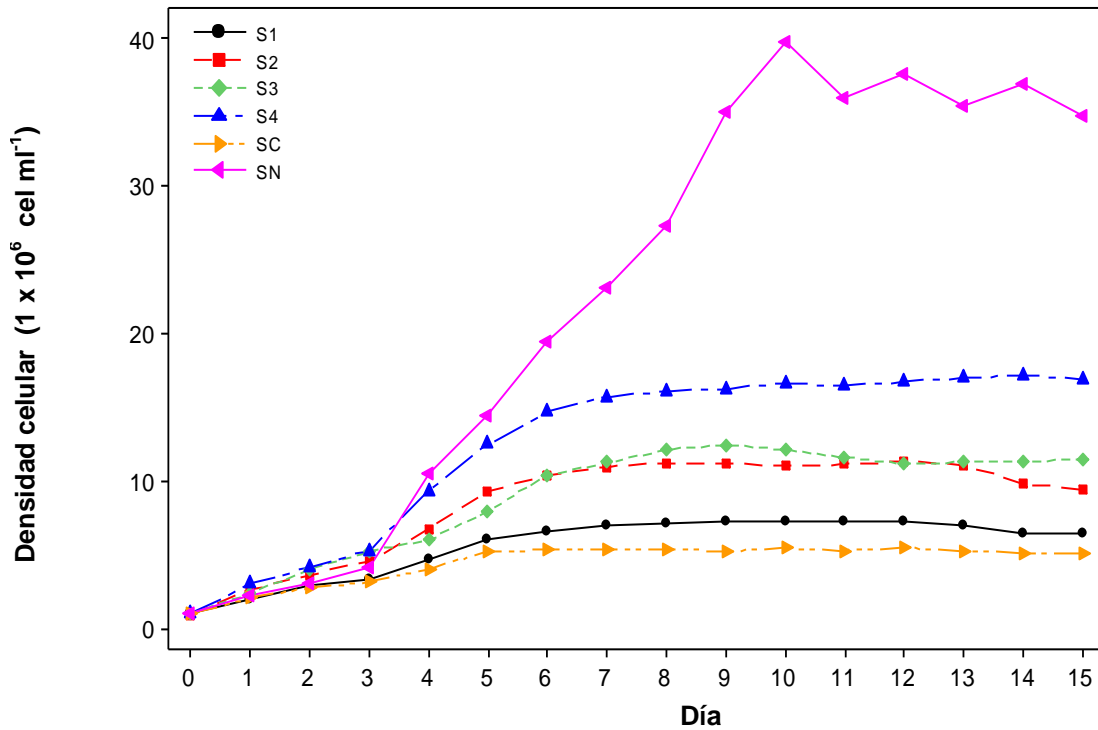


Figura 6. Comparación del contenido promedio de densidad celular (cel ml^{-1}), en cultivos estáticos de *Scenedesmus dimorphus* bajo 6 condiciones diferentes de cultivo, (nitrógeno:fósforo): S1 (bajo:bajo), S2 (bajo:alto), S3 (alto:bajo), S4 (alto:alto), SC (0:0), SN (nutrición normal), durante 15 días de cultivo.

A pesar de todas las diferencias mencionadas en el párrafo anterior, del análisis de varianza y posteriormente la prueba de comparación múltiple de Tukey se puede inferir que los tratamientos S1, S2, S3 y S4, no mostraron diferencias significativas en la densidad celular (promedio de todo el periodo experimental), siendo estadísticamente iguales, mientras que los tratamientos S4 y SN fueron los únicos tratamientos estadísticamente diferentes a SC ($p < 0.05$).

Aún así, a pesar de no existir diferencias significativas en la densidad celular en aquellos tratamientos en los cuales la concentración de nitrógeno y fósforo fue modificada, la tabla 8 muestra que la densidad celular promedio del tratamiento S4 y SN fueron superiores al resto de los tratamientos con valores promedio de 12.44×10^6 células ml^{-1} y 22.57×10^6 células ml^{-1} , además los tratamientos S2 y S3 registraron

promedios totales similares con un valores de 8.47 y 8.87×10^6 células ml^{-1} , respectivamente.

Las tasas de crecimiento promedio (μ) para *Scenedesmus dimorphus* cultivadas en los cuatro tratamientos (S1, S2, S3 y S4), además del control (SC) y el medio de nutrición normal (SN), no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). Se observó, para el tratamiento S4 y SN una mayor tasa de crecimiento, con valores de 0.26 y 0.32 día^{-1} , respectivamente; los tratamientos con menor tasa de crecimiento fueron el S1 (0.17 día^{-1}) y el control (0.15 día^{-1}). En cuanto a los tratamientos S2 y S3, al igual que en la densidad celular sus tasas de crecimiento fueron similares con valores promedio de 0.21 y 0.22 día^{-1} , respectivamente (Tabla 8).

7.1.1.1. Cuantificación de biomasa

Los resultados del análisis de varianza nitrógeno y están que la concentración de biomasa se vio afectada por la concentración inicial de nitrógeno y fósforo durante todas las fases de crecimiento exponencial ($p < 0.05$; Tabla 9)

Tabla 9. Efecto de la concentración de nitrógeno y fósforo en la concentración de biomasa de *Scenedesmus dimorphus* en diferentes fases de la curva de crecimiento en los tratamientos S1, S2, S3 y S4. I: día de inoculación; E: fase exponencial; ES: fase estacionaria; ET: fase estacionaria tardía. NS = no significativo; S = significativo ($p = 5\%$).

	Día	Nitrógeno		Fósforo		Interacción	
		P-valor	P < 0.05	P-valor	P < 0.05	P-valor	P < 0.05
I	0	0.329	NS	1.000	NS	0.609	NS
E	3	0.000	S	0.000	S	0.000	S
ES	6	0.000	S	0.000	S	0.152	NS
ES	9	0.000	S	0.000	S	0.422	NS
ES	12	0.000	S	0.000	S	0.000	S
ET	15	0.000	S	0.000	S	0.002	S

La concentración de biomasa también fue afectada por la fase de crecimiento (día) y por el tratamiento ($p < 0.05$), registrándose interacciones en todas las fases del cultivo. Al realizar el análisis estadístico de los resultados se obtuvieron las superficies a) y b) mostradas en la figura 7. En la figura 7a, se aprecia la superficie que resulta de la interacción de dos variables (día y tratamiento) y la función de respuesta (concentración biomasa). La figura 7b es la proyección de la concentración de biomasa en un plano día contra tratamiento. En ambas, se pueden observar las zonas en donde se encontró la mayor concentración de biomasa. De la figura 7b, se puede observar con mayor precisión, en que día se alcanzó la mayor concentración de biomasa para cada tratamiento.

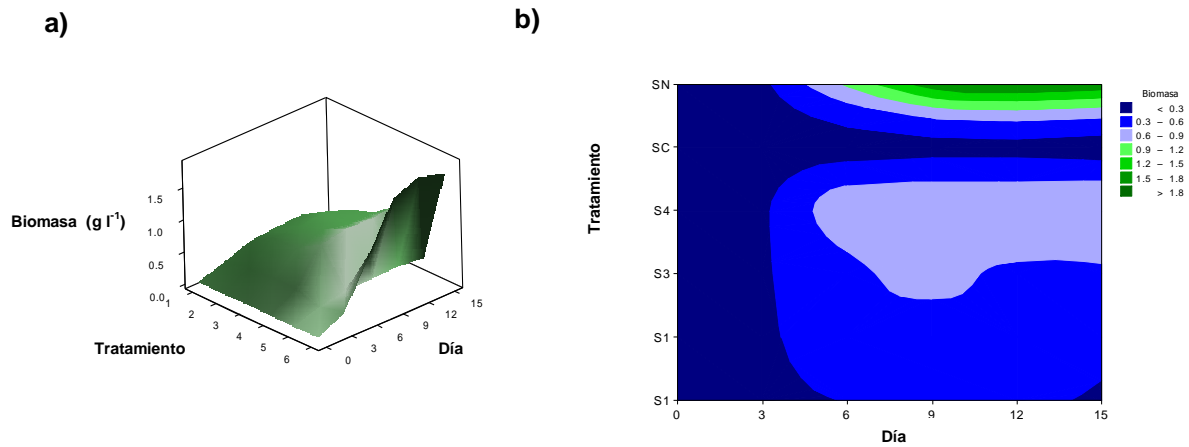


Figura 7. Superficies de respuesta: a) Superficie tridimensional día vs tratamiento y concentración de biomasa (g l^{-1}) para los tratamientos S1, S2, S3, S4, SC y SN. b) Contorno de la superficie día vs tratamiento y concentración de biomasa (Minitab 15)

Por lo tanto, de los resultados se puede deducir que los tratamientos que registraron los máximos valores promedio de biomasa fueron: S2 (0.39 g l^{-1}), S3 (0.44 g l^{-1}), S4 (0.60 g l^{-1}) y SN (1.06 g l^{-1}), alcanzados entre los días 6 y 15, presentando la misma tendencia con respecto a la densidad celular incrementándose a mayores concentraciones de nitrógeno y fosforo (Fig.8).

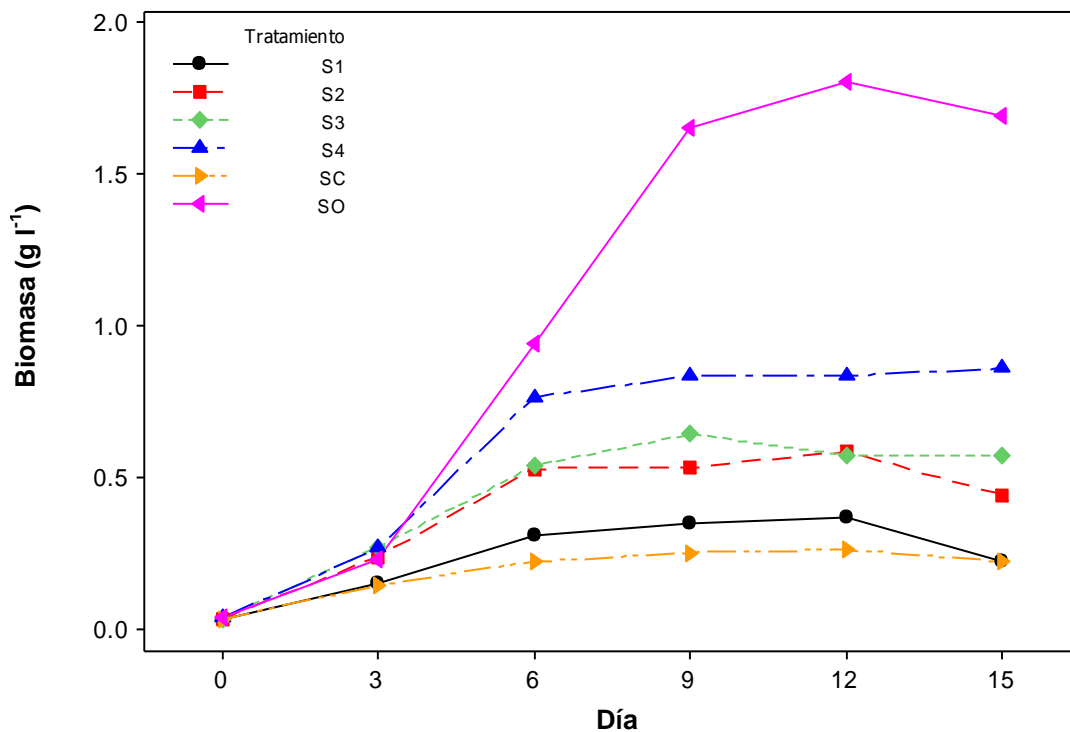


Figura 8. Comparación del contenido promedio de biomasa (g l^{-1}) en cultivos estáticos de *Scenedesmus dimorphus* bajo 6 condiciones de cultivo, (nitrógeno:fósforo): S1 (bajo:bajo), S2 (bajo:alto), S3 (alto:bajo), S4 (alto:alto), SC (0:0), SN (nutrición normal), durante 15 días de cultivo.

Los resultados del análisis de varianza muestran que no se registraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la concentración de biomasa alcanzada en los tratamientos S1, S2, S3, S4 y SC, solamente la concentración de biomasa alcanzada en el tratamiento SN fue estadísticamente diferente al resto de los tratamientos presentando diferencias significativas entre sus medias ($p < 0.05$), siendo este tratamiento el que mayor concentración de biomasa alcanzó con un valor de 1.06 g l^{-1} (Tabla 8).

Se encontró una correlación positiva entre la densidad óptica del cultivo y la concentración de biomasa, siendo así, se ajustó una línea de calibración entre dichas variables, por lo tanto la concentración de biomasa para *Scenedesmus dimorphus* también puede ser expresada por medio de una ecuación cuantitativa como: $y = 2.499x$

– 0.071; $R^2 = 0.993$ (y : concentración de biomasa; x : densidad óptica $A_{680 \text{ nm}}$). Siendo este otro método una manera fácil y rápida para determinar la concentración de biomasa

Cambios claros en el color de los cultivos fueron observados. Durante la fase exponencial (día 3 y 6) el color verde caracterizó a todos los cultivos, no fue sino hasta el séptimo día (fase estacionaria) cuando las células que fueron cultivadas bajo concentraciones limitantes de nitrógeno (S1, S2) cambiaron a un color marrón, mientras que en el tratamiento SC el cambio de color se presentó al tercer día. Por su parte los tratamientos S3, S4 y SN se mantuvieron así hasta el final del cultivo (Fig. 9 ,10).

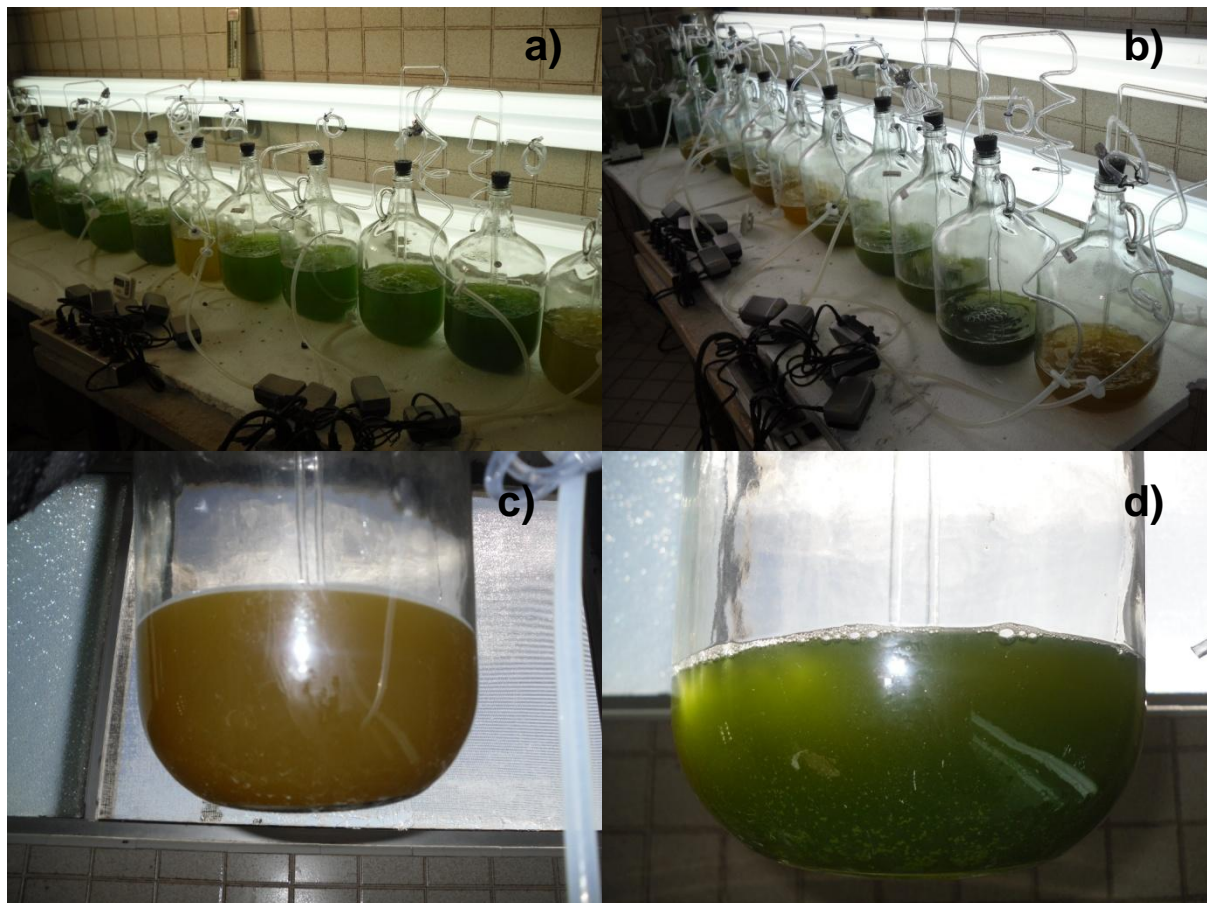


Figura 9. Cultivos de *Scenedesmus dimorphus*. a) cultivos en fase exponencial (día 6); b) cultivos en fase estacionaria (día 12); c) tratamiento S1 en fase estacionaria (día 12); d) tratamiento S4 en fase estacionaria (día 12).

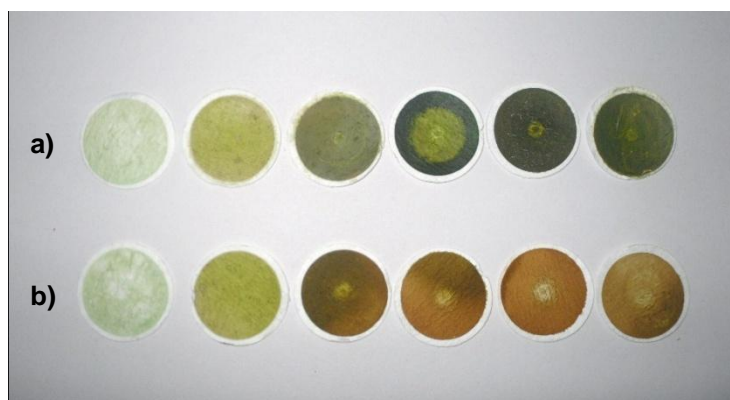


Figura 10. Coloraciones de biomasa en filtros de fibra de vidrio en diferentes fases del cultivo a) tratamiento S4; b) tratamiento S1.

7.1.1.2. Producción de biomasa

La productividad de biomasa se vio afectada por la concentración de nitrógeno y fósforo ($p < 0.05$), registrando la misma tendencia que en la densidad celular, incrementándose a mayor concentración de nitrógeno y fósforo. La productividad máxima para los tratamientos S1, S2, S3, S4 y SC se registró al final de la fase exponencial (día 6) con valores promedio de 0.05, 0.10, 0.09, 0.17, 0.04 $\text{g l}^{-1}\text{d}^{-1}$, mientras que el tratamiento que registró la producción más alta de biomasa fue sin duda SN con un valor promedio de 0.24 $\text{g l}^{-1}\text{d}^{-1}$ también se observó al sexto día. A partir del sexto día la producción de biomasa disminuyó para todos los tratamientos finalizando los cultivos con valores inferiores a 0.01 $\text{g l}^{-1}\text{d}^{-1}$. A pesar de las diferencias anteriormente mencionadas, el análisis de varianza y posteriormente la prueba de comparación múltiple de Tukey registraron la inexistencia de diferencias significativas ($p > 0.05$) en las medias de productividad de biomasa para cada uno de los tratamientos durante el desarrollo de los cultivos (Fig. 11)

En general, cuanto menor fue la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo, menor fue la productividad de la biomasa.

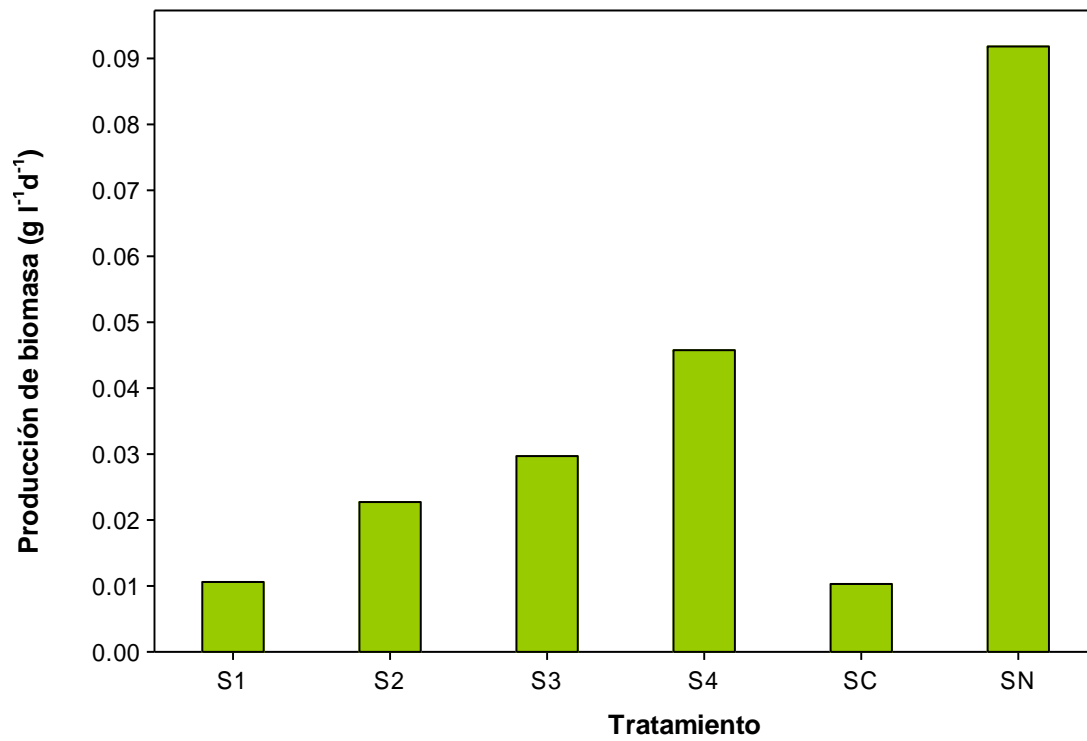


Figura 11. Promedio de producción de biomasa ($\text{g l}^{-1}\text{d}^{-1}$) durante todo el periodo experimental en *Scenedesmus dimorphus* cultivada bajo 6 condiciones de cultivo, (nitrógeno:fósforo): S1 (bajo:bajo), S2 (bajo:alto), S3 (alto:bajo), S4 (alto:alto), SC (0:0), SN (nutrición normal).

Tabla 8. Densidad celular, tasa de crecimiento, concentración de biomasa y producción de biomasa promedio de todo el periodo experimental para *Scenedesmus dimorphus* en los tratamientos S1, S2, S3, S4, además del tratamiento control y medio de nutrición normal. Letras iguales pertenecen al mismo grupo, por otro lado, medias con letras diferentes muestran una diferencia significativa entre sí.

Tratamiento	Concentración celular (x 10 ⁶ células ml ⁻¹)	Tasa de crecimiento (dia ⁻¹)	Concentración de biomasa (g l ⁻¹)	Producción de biomasa (gl ⁻¹ d ⁻¹)
S1	5.59 ^a	0.17 ^a	0.24 ^a	0.01 ^a
S2	8.47 ^a	0.21 ^a	0.39 ^a	0.02 ^a
S3	8.87 ^a	0.22 ^a	0.44 ^a	0.03 ^a
S4	12.44 ^{ab}	0.26 ^a	0.60 ^a	0.05 ^a
Control	4.45 ^{ac}	0.15 ^a	0.19 ^a	0.01 ^a
Normal	22.57 ^d	0.32 ^a	1.06 ^b	0.09 ^a

7.2. Composición química de la biomasa de *Scenedesmus dimorphus*.

7.2.1. Lípidos totales

El contenido lipídico en las células que se utilizaron como inóculo registró una concentración promedio de aproximadamente 14.59 % para cada uno de los tratamientos. A lo largo del desarrollo del cultivo la concentración de este constituyente mostró un comportamiento similar entre tratamientos, al disminuir ligeramente su concentración durante los primeros tres días de cultivo, dicha disminución corresponde a un aumento en la densidad celular (fase exponencial), registrando un valor promedio general por tratamiento de aproximadamente 14.06 %. No obstante, al inicio de la fase estacionaria (día 6) el contenido de lípidos en los tratamientos S1, S2 y SC, aumentó aproximadamente el doble de su concentración (a partir de la fase exponencial),

registrando valores promedio de 29.47, 24.55 y 35.09 %, respectivamente. Mientras que al inicio de la fase estacionaria, el contenido de lípidos en los tratamientos S3 y S4 aumentaron su concentración aunque en menor medida llegando a valores promedio de 19.81 y 17.56 %, respectivamente, en cambio el contenido de lípidos del tratamiento SN no mostró cambios en el contenido de lípidos a este día, registrando un valor promedio de 14.06 %.

Cuando los cultivos se encontraban dentro la fase estacionaria (día 9) los tratamientos S1, S2 y SC alcanzaron su máximo contenido de lípidos registrando valores promedio de 42.11, 38.74 y 44.03 %, respectivamente. Aun así, el contenido de lípidos en los tratamientos S3, S4 y SN aumentó aunque en menor medida logrando valores promedio de 25.37, 19.57 y 20.30 %, siendo estadísticamente superior el contenido lipídico obtenido por el tratamiento S3 ($p < 0.05$). Es importante mencionar, que a medida que el cultivo avanzaba y los cultivos aun se encontraban dentro de la fase estacionaria (día 12) la concentración de lípidos de los tratamientos S1, S2 y SC empezó a descender, mientras que el contenido de lípidos de los tratamientos S3, S4 y SN siguió en ascenso. El contenido de lípidos total a lo largo de toda la fase estacionaria (día 6-12) para los tratamientos S1, S2, S3, S4, SC y SN fue de 36.56, 33.29, 24.00, 20.650, 38.38, 18.388 % (Fig.13).

No fue sino hasta el final del cultivo, cuando las células se encontraban en fase estacionaria tardía (día 15) cuando el contenido de lípidos de los tratamientos S1, S2 y SC, mostraron sus mínimas concentraciones registrando valores promedio de 22.97, 22.17 y 21.09 %, respectivamente. Mientras que el contenido de lípidos en los tratamientos S3, S4 y SN registraron sus máximas concentraciones durante todo el desarrollo del cultivo logrando valores promedio de 31.86, 33.48 y 28.04%, respectivamente. La figura 12 muestra el contenido promedio de lípidos registrado durante las distintas fases de crecimiento de *Scenedesmus dimorphus* durante un periodo de cultivo de 15 días, fue claro que durante la fase estacionaria se observó un mayor contenido lipídico en las células.

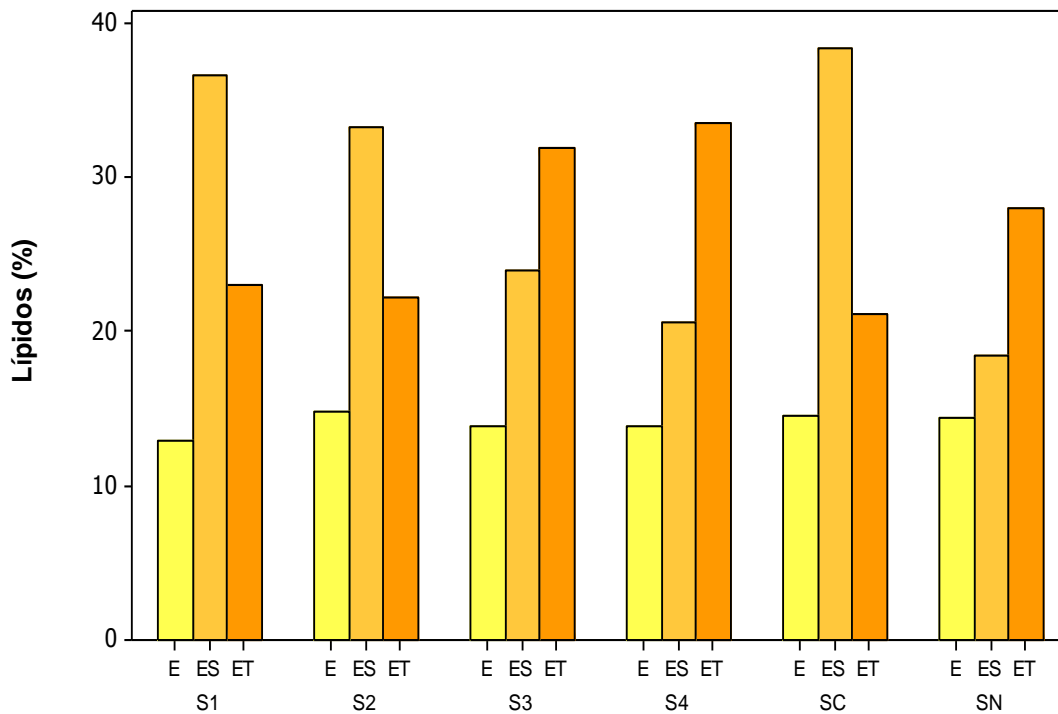


Figura 12. El contenido promedio de lípidos (%) registrado durante las distintas fases de crecimiento de *Scenedesmus dimorphus* durante un periodo de cultivo de 15 días. E: fase exponencial (día 3); ES: fase estacionaria (día 6-12); ET: fase estacionaria tardía (día 15).

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) nos muestran que el contenido de lípidos se vio afectado por la concentración de nitrógeno y fósforo, sin alguna interacción significativa a lo largo del desarrollo del cultivo ($p > 0.05$). Observándose también que durante la fase de crecimiento exponencial las concentraciones de dichas variables no afectaron el contenido lipídico de las células. En cambio, durante la gran parte de la fase estacionaria tanto la concentración de nitrógeno como la de fósforo afectaron de manera significativa ($p < 0.05$) el contenido de lípidos, el análisis de los efectos principales muestra que la mayor concentración de lípidos se registró en aquellos tratamientos que contenían los niveles más bajos de nitrógeno y que el fosforo afecto en menor medida a dicho aumento (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto de la concentración de nitrógeno y fósforo en el contenido de lípidos de *Scenedesmus dimorphus* en diferentes fases de la curva de crecimiento en los tratamientos S1, S2, S3 y S4. I: día de inoculación; E: fase exponencial; ES: fase estacionaria; ET: fase estacionaria tardía. NS: no significativo; S: significativo ($\alpha = 5\%$).

	Día	Nitrógeno		Fósforo		Interacción	
		P-valor	P < 0.05	P-valor	P < 0.05	P-valor	P < 0.05
I	0	0.381	NS	0.131	NS	0.137	NS
E	3	0.998	NS	0.492	NS	0.537	NS
ES	6	0.001	S	0.027	S	0.271	NS
ES	9	0.000	S	0.006	S	0.242	NS
ES	12	0.001	S	0.264	NS	0.869	NS
ET	15	0.001	S	0.703	NS	0.294	NS

La figura 13 muestra el desarrollo de las concentraciones de lípidos en cada uno de los tratamientos, registrando un comportamiento ascendente conforme trascurrían los cultivos, aumentando su concentración en mayor medida en aquellos tratamientos que fueron cultivados a bajas concentraciones de nitrógeno.

Los resultados anteriores muestran que el contenido de lípidos no solo se vio afectado por la concentración de nitrógeno, sino también por la fase de crecimiento y tratamiento. Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) muestra una interacción significativa entre la fase de crecimiento (día) y el tratamiento, al realizar el análisis estadístico de los resultados se obtuvieron las superficies a) y b) de la figura 14. En la figura 14a, se aprecia la superficie que resulta de la interacción de dos variables (día y tratamiento) y la función de respuesta (concentración de lípidos). La figura 14b es la proyección de la concentración de lípidos en un plano día contra tratamiento. En ambas, se puede observar las zonas en donde se encontró la mayor concentración de lípidos.

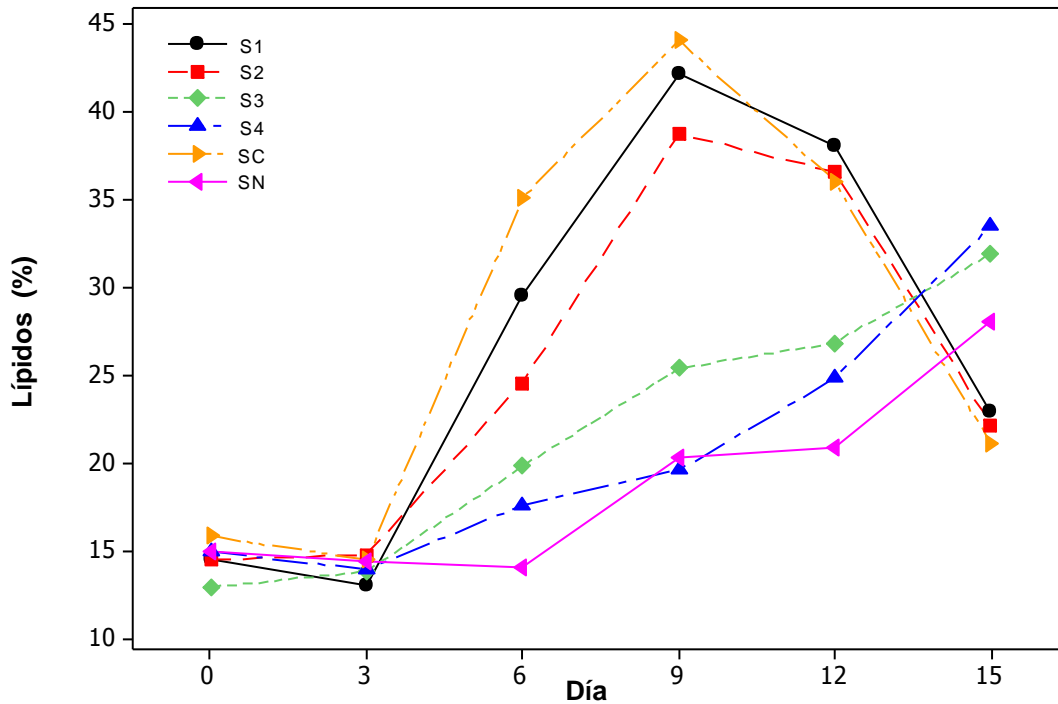


Figura 13. Comparación del contenido promedio de lípidos (%), en cultivos estáticos de *Scenedesmus dimorphus* bajo 6 condiciones de cultivo, (nitrógeno:fósforo): S1 (bajo:bajo), S2 (bajo:alto), S3 (alto:bajo), S4 (alto:alto), SC (0:0), SN (nutrición normal), durante 15 días de cultivo.

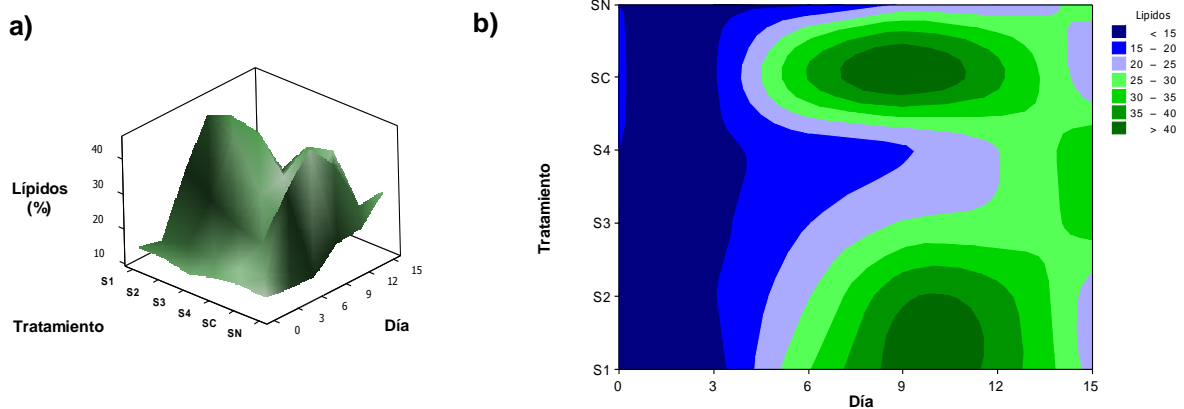


Figura 14. Superficies de respuesta: a) Superficie tridimensional día vs tratamiento y concentración de lípidos (%) para los tratamientos S1, S2, S3, S4, SC y SN. b) Contorno de la superficie día vs tratamiento y concentración de lípidos (Minitab 15).

Los resultados del análisis de varianza muestra la existencia de diferencias significativas en la concentración de lípidos en los días de análisis (día 0, 3, 6 9, 12 y 15). Mientras que el análisis de comparación múltiple de Tukey, mostró que la máxima concentración de lípidos se observó durante la fase estacionaria en el día 9 con un valor promedio 31.69 % y al día 12 con un valor de 30.53 %, sin mostrar diferencias significativas entre ellos. Una posible alternativa sería considerar el noveno día como óptimo, ya que a mayores días de cultivo, no es conveniente desde el punto de vista del consumo de energía. Por su parte las mínimas concentraciones de lípidos se presentaron al tercer día (14.06 %), sin observarse diferencias significativas respecto al día de la inoculación (día 0; Tabla 11).

Al analizar los resultados del análisis de varianza se observaron diferencias significativas entre el contenido de lípidos durante el periodo experimental de cada uno de los tratamientos, posteriormente el análisis de comparación múltiple de Tukey mostró que los tratamientos que lograron un mayor contenido de lípidos fueron S1, S2 y SC con valores promedio durante todo el periodo experimental de 26.68, 25.21 y 27.76 %, respectivamente, sin mostrar diferencias significativas entre sus medias ($p > 0.05$), mientras la mínima concentración se registró en el tratamiento SN con un valor promedio de 18.76 %, (Tabla 11).

Tabla 11. Contenido de lípidos promedio (%) durante todo el periodo experimental de *Scenedesmus dimorphus* cultivada bajo 6 condiciones de cultivo (nitrógeno:fósforo): S1 (bajo:bajo), S2 (bajo:alto), S3 (alto:bajo), S4 (alto:alto), SC (0:0), SN (nutrición normal). Letras iguales pertenecen al mismo grupo, por otro lado, medias con letras diferentes muestran una diferencia significativa entre sí.

Día	Tratamiento						Promedio por día
	S1	S2	S3	S4	SC	SN	
0	14.45 ±1.44	14.47 ±0.03	12.92 ±0.53	14.95 ±0.04	15.81 ±1.59	14.94 ±1.07	14.59 ^a
3	12.98 ±1.09	14.74 ±2.47	13.81 ±2.21	13.91 ±0.28	14.80 ±1.79	14.41 ±0.41	14.06 ^a
6	29.47 ±1.30	24.55 ±0.64	19.81 ±1.86	17.56 ±1.79	35.09 ±0.71	14.06 ±2.32	23.42 ^b
9	42.11±1.24	38.74 ±0.85	25.37 ±0.76	19.60 ±1.84	44.03 ±1.11	20.29 ±0.84	31.69 ^c
12	38.10 ±0.62	36.57 ±3.40	26.84 ±1.01	24.83 ±1.43	36.02±2.36	20.81 ±3.48	30.53 ^c
15	22.97±0.61	22.17 ±1.42	31.86 ±1.34	33.50 ±1.91	21.09 ±5.88	28.04 ±1.65	26.60 ^d
Promedio por tratamiento	26.68 ^a	25.21 ^{ab}	21.77 ^b	20.72 ^c	27.76 ^{cd}	18.76 ^d	23.48

7.2.1.1. Producción de lípidos.

La producción de lípidos es una resultante de la cantidad de biomasa y el contenido celular de lípidos, así que la generación de biocombustibles a partir de microalgas depende principalmente de estos dos factores. Dichos parámetros afectan la viabilidad económica del aceite de microalgas para la producción de biodiesel.

El contenido de lípidos en los tratamientos S1, S2 y SC fue sustancialmente superior al resto de los tratamientos en todo el periodo experimental (Fig. 13), sin embargo fue compensado con una baja productividad de biomasa debido a las condiciones deficientes de nitrógeno (Fig. 11), sin efecto beneficioso en términos de productividad de lípidos. Los niveles más bajos de productividad de lípidos se presentaron en los tratamientos S1, S2 y SC con valores promedio de 0.003, 0.005, 0.003 g l⁻¹ d⁻¹ (durante

todo el periodo experimental) y fueron debidos a la baja productividad de biomasa que en ellos se registró.

Debido a las altas concentraciones de nutrientes en los tratamientos S3, S4 y SN, el contenido de lípidos en las células fueron bajos en comparación con los otros tratamientos, sin embargo, registró altos valores en productividad de biomasa beneficiando fundamentalmente los valores de productividad de lípidos, registrando el nivel más alto en el tratamiento SN con un valor promedio durante todo el desarrollo experimental de $0.015 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, no menos importante fue la productividad del tratamiento S4 con un valor promedio de $0.008 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Registrando diferencias significativas solamente entre SC y SN ($p < 0.05$).

Las máximas productividades de lípidos en la mayoría de los tratamientos se registraron al final de la fase exponencial (día 6), solamente el tratamiento SN registró su valor máximo al noveno día, con valores máximos promedio de 0.015, 0.023, 0.017, 0.029, 0.009 y 0.048 $\text{g l}^{-1}\text{d}^{-1}$, en los tratamientos S1, S2, S3, S4, SC y SN, respectivamente (Fig. 15).

En la mayoría de los casos la productividad de los lípidos fue inversamente proporcional al contenido de lípidos acumulado por la célula y proporcional a la productividad de biomasa.

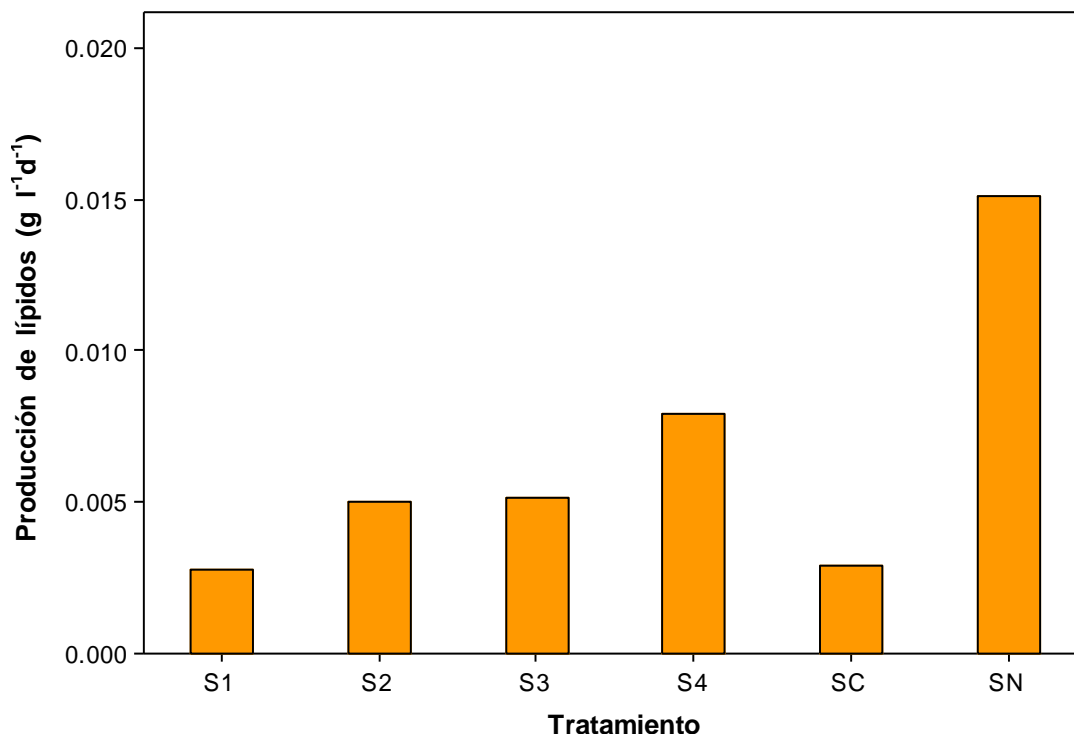


Figura 15. Productividad de lípidos promedio (g l⁻¹d⁻¹) durante todo el periodo experimental de *Scenedesmus dimorphus* cultivada bajo 6 diferentes condiciones de cultivo (nitrógeno:fósforo): S1 (bajo:bajo), S2 (bajo: alto), S3 (alto:bajo), S4 (alto:alto), SC (0:0), SN (nutrición normal).

7.2.1.2. Análisis lipídico

La acumulación de lípidos en *Scenedesmus dimorphus* en los diferentes tratamientos se determinó utilizando el método del rojo nilo, reportado por Lee *et al* (1998), se realizó a través de una solución fluorescente que tiñe los lípidos neutros y se utilizó un espectrofotómetro para medir la intensidad de los lípidos neutros celulares. Las unidades utilizadas para las mediciones fueron RFU (unidades relativas de fluorescencia), las cuales son unidades arbitrarias relacionadas a la intensidad de fluorescencia emitida por los lípidos neutros.

Los resultados demostraron que la fluorescencia más alta y por lo tanto el contenido de lípidos neutros más abundante en las células de *Scenedesmus dimorphus* cultivadas bajo distintas concentraciones de nitrógeno y fósforo se registraron en la fase

estacionaria en los tratamientos S1, S2 y SC incrementando su contenido lipídico aproximadamente dos veces más a partir de la fase exponencial (Fig. 16a).

En cambio, cuando las células fueron cultivadas bajo altas concentraciones de nitrógeno (S3, S4 y SN), el contenido de lípidos neutros fue más bajo en la fase estacionaria aumentando sus niveles de lípidos neutros hasta la fase estacionaria tardía (Fig. 16a).

Los resultados del análisis de varianza indican que no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el contenido de lípidos promedio para cada uno de los tratamientos durante el desarrollo experimental. Sin embargo, los tratamientos S1, S2 y SC mostraron la fluorescencia más alta y por lo tanto un contenido de lípidos neutros más abundante (Fig. 16b).

Por lo tanto, de los resultados se puede inferir que se registró una mayor acumulación de lípidos neutros en aquellos tratamientos suplementados con bajas concentraciones de nitrógeno.

La intensidad de fluorescencia relativa del rojo nilo se comparó con el rendimiento gravimétrico del total de lípidos celulares. Se obtuvo una ecuación de regresión que indica que la intensidad de fluorescencia se correlaciona linealmente con el contenido de lípidos totales que se determinaron gravimétricamente:

$$y = 0.174x - 7.299$$

Donde y: contenido de lípidos totales determinado gravimétricamente; x: valor relativo de fluorescencia a 580 nm a 10^6 células tenidas con solución rojo nilo, $R^2 = 0.981$.

Los resultados indican que el incremento de los lípidos totales en *Scenedesmus dimorphus* se le atribuyó principalmente a un aumento en el contenido de lípidos neutros.

A diferencia de la determinación de lípidos por gravimetría, este método (rojo nilo) permite determinar el contenido de lípidos con mayor facilidad, además que no consume tiempo y no requiere demasiada biomasa. Por lo tanto, la espectrofluorometría es un método conveniente y fiable para la determinación y acumulación de lípidos celulares.

Con base en los resultados, la acumulación de lípidos en *Scenedesmus dimorphus* bajo diferentes condiciones de crecimiento pueden ser fácilmente inspeccionados mediante espectrofotometría con rojo nilo.

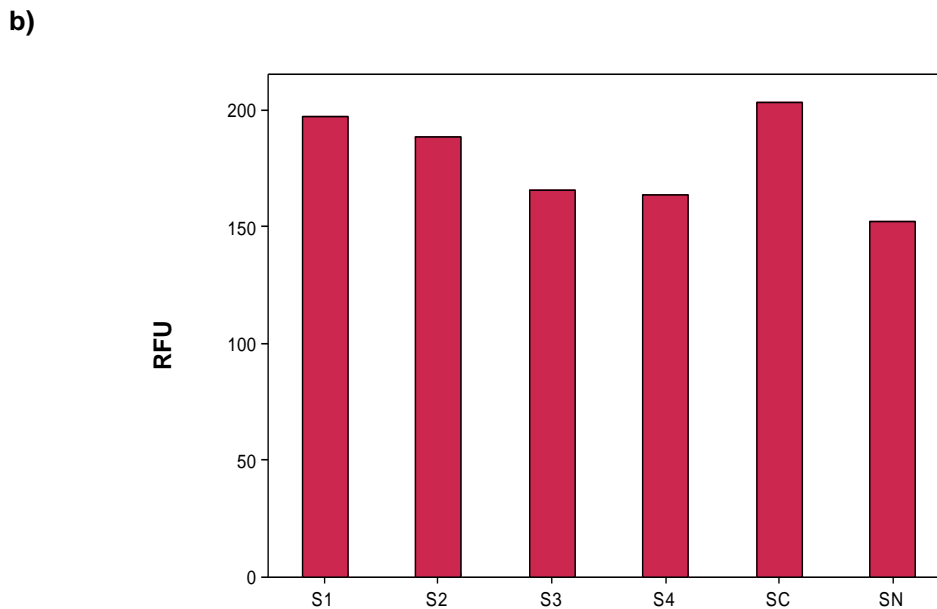
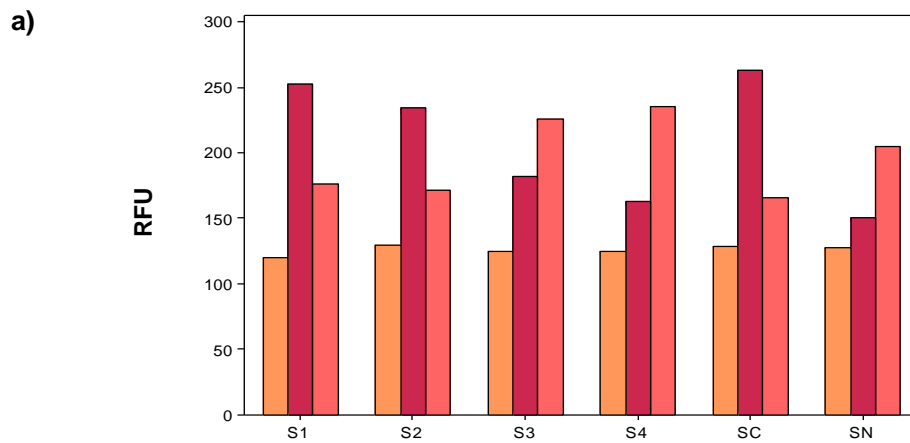


Figura 16. Medición de lípidos neutros de *Scenedesmus dimorphus* utilizando una solución fluorescente rojo nilo cultivada bajo 6 diferentes condiciones de cultivo (nitrógeno:fósforo): S1 (bajo:bajo), S2 (bajo:alto), S3 (alto:bajo), S4 (alto:alto), SC (0:0), SN (nutrición normal). a: lípidos neutros para cada tratamiento por fase de crecimiento, b: lípidos neutros promedio por tratamiento durante todo el periodo experimental.

7.2.2. Proteínas totales

El contenido de proteínas en base al peso seco en las células que se utilizaron como inóculo registró una concentración promedio de aproximadamente 43.54 % para cada uno de los tratamientos. Durante el desarrollo del cultivo el contenido de proteína mostró un comportamiento descendente y presentó un ligero aumento en su contenido durante la fase exponencial (día 3), registrando un valor promedio general por tratamiento de aproximadamente 44.45 %.

Sin embargo, cuando los cultivos se encontraban al inicio de la fase estacionaria (día 6) y el crecimiento celular empezó a disminuir, el contenido de proteína decreció un 50 % en los tratamientos S1, S2 y SC con valores promedio de 23.42, 24.93 y 19.50 %, respectivamente. Mientras que en los tratamientos S3, S4 y SN, se observó una disminución solamente del 10% con valores promedio de 39.80, 35.80 y 40.45 %, aproximadamente. Al finalizar la fase estacionaria (día 12), el contenido de proteína en los tratamientos S1, S2 y SC, ya había disminuido casi un 80 % registrando valores promedio de 10.83, 12.62, 6.98 %, mientras que el contenido de este constituyente en los tratamientos S3, S4 y SN solamente registró una disminución del 45% (a partir de la fase exponencial) con valores promedio de 22.00, 26.39 y 23.8 %, respectivamente. El contenido de proteína total a lo largo de toda la fase estacionaria (día 6-12) para los tratamientos S1, S2, S3, S4, SC y SN fue de 16.10, 18.15, 30.42, 31.75, 12.21 y 32.94 %, respectivamente (Fig. 17).

El contenido de proteína disminuyó durante el periodo experimental, por ello, las mínimas concentraciones se registraron durante la fase estacionaria tardía (día 15) con

valores promedio de 6.49, 7.76, 20.25, 22.75, 10.62 y 17.93 % en los tratamientos S1, S2, S3, S4, SC y SN, respectivamente (Fig. 17).

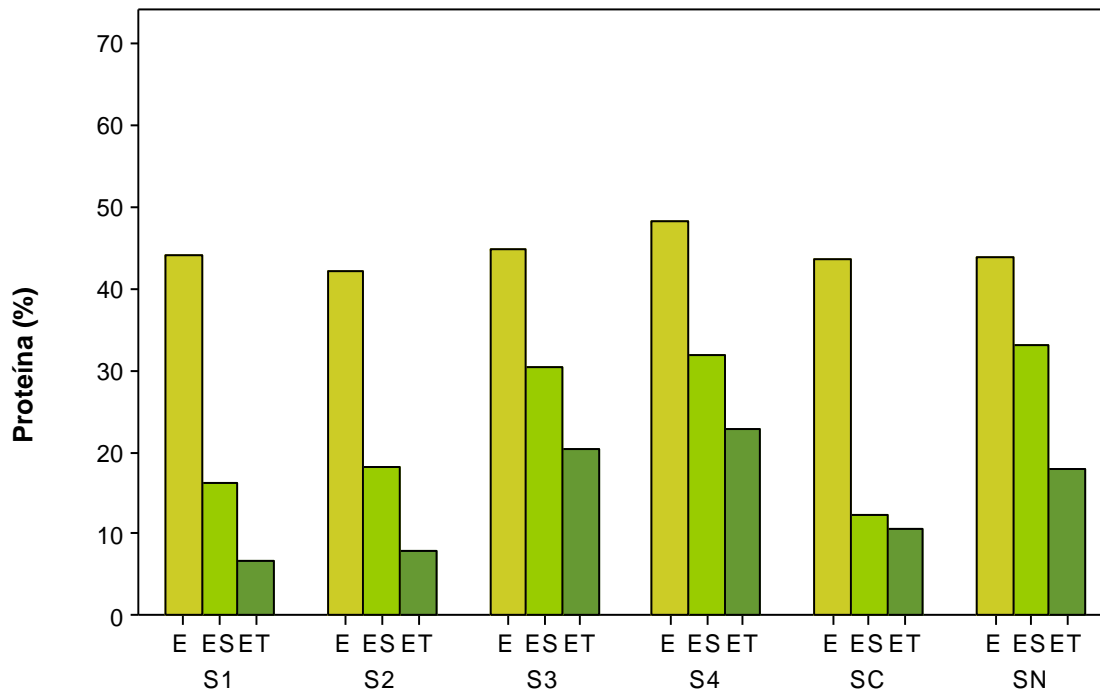


Figura 17. Contenido promedio de proteína (%) registrado durante las distintas fases de crecimiento de *Scenedesmus dimorphus* durante un periodo de cultivo de 15 días. E: fase exponencial (día 3); ES: fase estacionaria (día 6-12); ET: fase estacionaria tardía (día 15).

Los resultados obtenidos además del análisis de varianza (ANOVA) nos muestran que el contenido celular de proteína se vio afectado por la concentración de nitrógeno durante todas las fases de crecimiento ($p < 0.05$), mientras que la concentración de fósforo afecto en menor medida el contenido de este constituyente ($p > 0.05$; Tabla 12).

Tabla 12. Efecto de la concentración de nitrógeno y fósforo en el contenido de proteína de *Scenedesmus dimorphus* en diferentes fases de la curva de crecimiento en los tratamientos S1, S2, S3 y S4. I: día de inoculación; E: fase exponencial; ES: fase estacionaria; ET: fase estacionaria tardía. NS = no significativo; S = significativo ($\alpha = 5\%$).

Fase	Día	Nitrógeno		Fósforo		Interacción	
		P-valor	P < 0.05	P-valor	P < 0.05	P-valor	P < 0.05
I	0	0.425	NS	0.749	NS	0.627	NS
E	3	0.020	S	0.445	NS	0.040	S
ES	6	0.001	S	0.452	NS	0.147	NS
ES	9	0.000	S	0.070	NS	0.751	NS
ES	12	0.005	S	0.244	NS	0.596	NS
ET	15	0.000	S	0.144	NS	0.586	NS

Al ser el nitrógeno la única variable significativa que afecta a la concentración de proteína, el análisis de efectos principales muestra que a concentraciones mayores de nitrógeno se registran mayores concentraciones de proteína, la figura 18 muestra el desarrollo de las concentraciones de proteína en cada uno de los tratamientos, registrando un comportamiento descendente conforme transcurría el cultivo, disminuyendo su concentración en menor medida en aquellos tratamientos que fueron cultivados bajo altas concentraciones de nitrógeno. Dicho en otras palabras se puede decir que la concentración de proteína también se vio afectada por la fase de crecimiento (día) y el tratamiento, al realizar el análisis estadístico de los resultados se obtuvieron las superficies a) y b) de la figura 19. En la figura 19a, se aprecia la superficie que resulta de la interacción de dos variables (día y tratamiento) y la función de respuesta (concentración de proteína). La figura 19b es la proyección de la concentración de proteína en un plano día contra tratamiento. En ambas, se puede observar las zonas en donde se encontró la mayor concentración de proteína. De la

figura 19b, se puede observar con mayor precisión, en que día se alcanzó la mayor concentración de proteína para cada tratamiento.

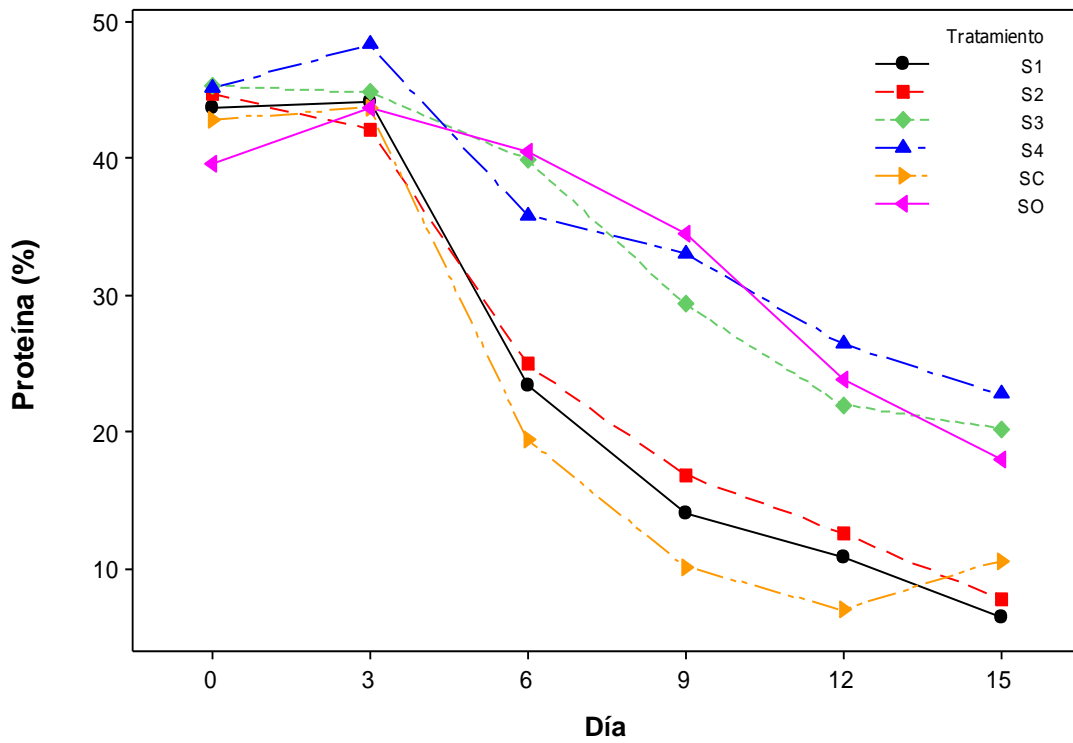


Figura 18. Comparativo del contenido promedio de proteínas (%), en cultivos estáticos de *Scenedesmus dimorphus* bajo 6 condiciones de cultivo, (nitrógeno:fósforo): S1 (bajo:bajo), S2 (bajo:alto), S3 (alto:bajo), S4 (alto:alto), SC (0:0), SN (nutrición normal), durante 15 días de cultivo.

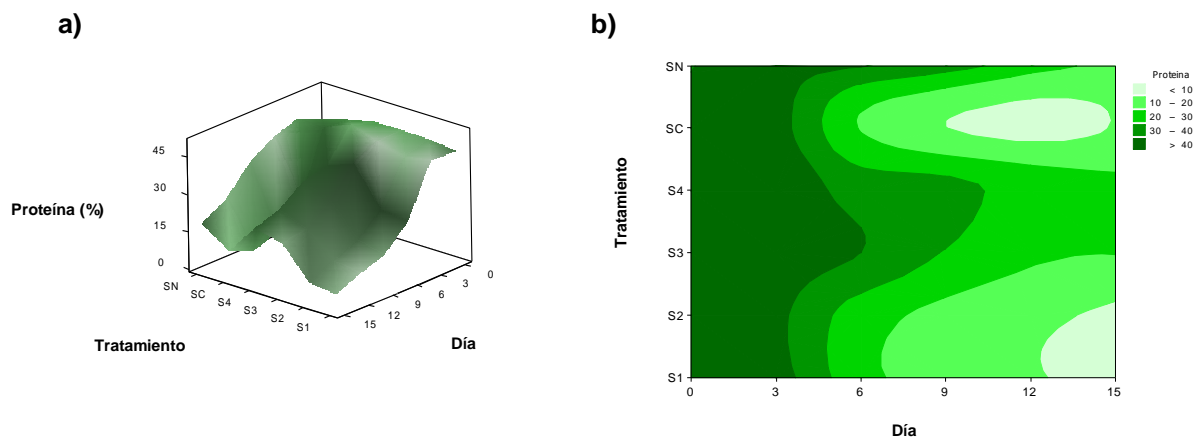


Figura 19. Superficies de respuesta: a) Superficie tridimensional día vs tratamiento y concentración de proteína (%) para los tratamientos S1, S2, S3, S4, SC y SN. b) Contorno de la superficie día vs tratamiento y concentración de proteína (Minitab 15)

Por lo tanto de los resultados se puede inferir, que los máximos valores de proteína se presentaron durante la fase exponencial en todos los tratamientos (día 3; Tabla 13), con valores superiores al 40 %. Por su parte, las mínimas concentraciones se observaron en la fase estacionaria tardía (día 15) con valores inferiores al 10 % en aquellos tratamientos que contenían concentraciones bajas de nitrógeno, mientras que las células que fueron cultivadas bajo altas concentraciones de nitrógeno registró valores de alrededor del 20 %.

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se comprobó que las concentraciones de proteína (promedio de todo el desarrollo experimental) en los diferentes tratamientos no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$). Aún así los tratamientos que contenían las concentraciones más altas de nitrógeno (S3, S4 y SN) registraron las concentraciones más elevadas de proteína con valores promedio de 33.60, 35.23 y 33.35 %, respectivamente (Tabla 13).

Tabla 13. Contenido de proteína promedio (%) durante todo el periodo experimental de *Scenedesmus dimorphus* cultivada bajo 6 condiciones de cultivo (nitrógeno:fósforo): S1 (bajo:bajo), S2 (bajo:alto), S3 (alto:bajo), S4 (alto:alto), SC (0:0), SN (nutrición normal).

Día	Tratamiento						Promedio por día
	S1	S2	S3	S4	SC	SN	
0	43.67 ±2.10	43.68 ±2.32	45.31 ±2.32	45.10 ±3.82	42.86 ±0.91	39.64 ±0.69	43.54
3	44.08 ±0.77	42.12 ±1.24	44.79 ±0.33	48.30 ±2.10	43.67 ±0.86	43.73 ±2.24	44.45
6	23.42 ±3.32	24.93 ±1.24	39.94 ±1.24	35.80 ±0.98	19.49 ±1.42	40.00 ±1.23	30.67
9	13.06 ± 3.88	16.89 ±1.43	31.83 ±2.34	33.07 ±0.46	11.15 ±1.19	34.53 ±0.84	23.01
12	10.83 ±1.59	12.62 ±0.46	22.00 ±1.50	26.39 ±6.00	6.98 ±1.42	23.84 ±2.14	17.11
15	6.49 ±0.40	7.76 ±1.00	20.25 ±1.00	22.75 ±2.75	10.62 ±1.93	16.93 ±2.42	14.30
Promedio por tratamiento	23.76	24.83	33.60	35.23	22.30	33.35	28.85

7.2.3. Carbohidratos totales.

El contenido de carbohidratos mostró una tendencia similar y ascendente a lo largo del desarrollo del cultivo. La concentración de carbohidratos en las células que se utilizaron como inóculo registró un promedio de aproximadamente 14.30%, sin embargo, el contenido de carbohidratos disminuyó en todos los tratamientos cuando las células estaban en fase de crecimiento exponencial hasta llegar a un valor promedio general por tratamiento de 12.26 % , a medida que transcurrió el cultivo se mostraron similitudes en la tendencia en el contenido de carbohidratos entre los tratamientos S1, S2 y SC, estos tratamientos aumentaron el doble el contenido de carbohidratos al inicio de la fase estacionaria (día 6) llegando a valores promedio de 24.06, 26.06 y 30.27 %, respectivamente, mientras que los tratamientos S3, S4 y SN registraron un contenido de carbohidratos menor con valores promedio de 20.11, 23.72 y 17.26 %, respectivamente (Fig. 20). No fue sino hasta el noveno día cuando las células se encontraban en fase estacionaria cuando los tratamientos S1, S2 y SC alcanzaron los niveles máximos registrando un contenido de carbohidratos de 40.14, 38.79, y 38.02 %, respectivamente, mientras que los tratamientos S3, S4 y SN aumentaron también su contenido de carbohidratos pero en menor medida que los tratamientos anteriores (S1, S2 y SC) registrando valores promedio de 26.51, 29.72 y 26.43 %, respectivamente. El contenido de carbohidratos total a lo largo de toda la fase estacionaria (día 6-12) para los tratamientos S1, S2, S3, S4, SC y SN fue de 33.45, 34.43, 26.01, 28.70, 34.80, 25.95 %, respectivamente (Fig. 20).

En cambio, durante la fase estacionaria tardía (día 15) el contenido de carbohidratos disminuyó hasta 27.54, 25.85 y 30.02 %, en los tratamientos S1, S2 y SC, respectivamente. Mientras el contenido de carbohidratos en los tratamientos S3, S4 y SN alcanzaron su máxima concentración registrando valores promedio de 34.36, 34.58 y 37.29% (Fig. 20).

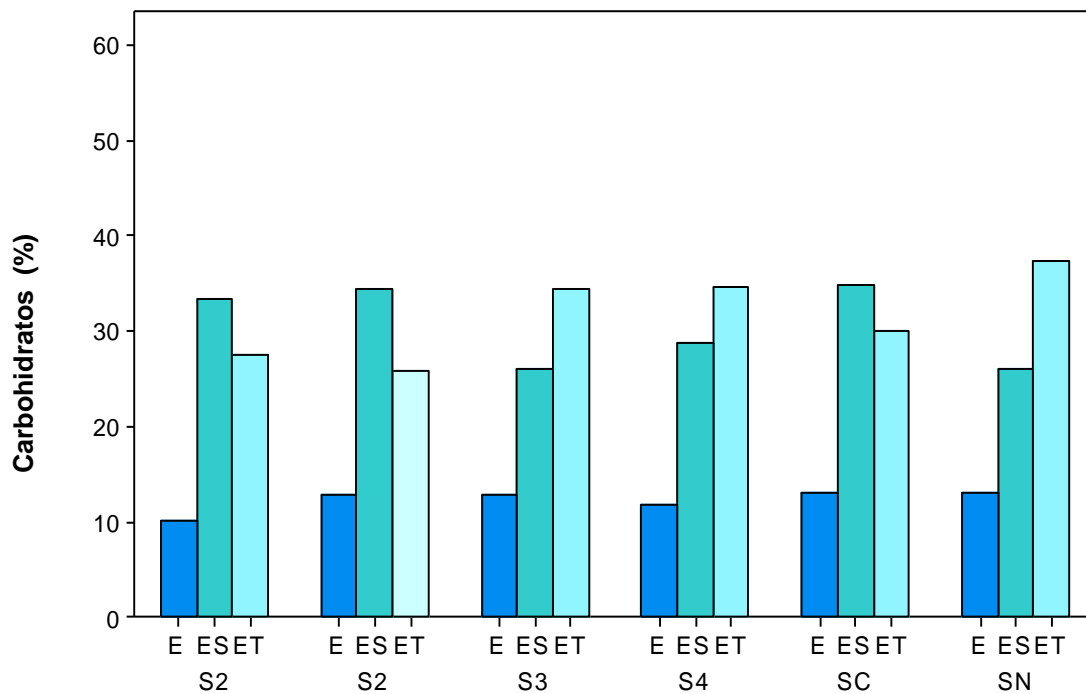


Figura 20. Contenido promedio de carbohidratos (%) registrado durante las distintas fases de crecimiento de *Scenedesmus dimorphus* durante un periodo de cultivo de 15 días. E: fase exponencial (día 3); ES: fase estacionaria (día 6-12); ET: fase estacionaria tardía (día 15).

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) muestran que el contenido de carbohidratos se vio afectado en mayor medida por la concentración de nitrógeno (Tabla 14). Por lo tanto, al ser el nitrógeno la variable que mayormente afecta el comportamiento del contenido de carbohidratos, los resultados de los efectos principales (nitrógeno y fósforo) se puede inferir que los tratamientos con menor concentración de nitrógeno fueron los que registraron el mayor contenido de carbohidratos.

Tabla 14. Efecto de la concentración de nitrógeno y fósforo en el contenido de carbohidratos de *Scenedesmus dimorphus* en diferentes fases de la curva de crecimiento en los tratamientos S1, S2, S3 y S4. I: día de inoculación; E: fase exponencial; ES: fase estacionaria; ET: fase estacionaria tardía. NS = no significativo; S = significativo ($\alpha = 5\%$).

	Día	Nitrógeno		Fósforo		Interacción	
		P-valor	P < 0.05	P-valor	P < 0.05	P-valor	P < 0.05
I	0	0.806	NS	0.400	NS	0.856	NS
E	3	0.759	NS	0.742	NS	0.508	NS
ES	6	0.006	S	0.009	S	0.248	NS
ES	9	0.001	S	0.470	NS	0.123	NS
ES	12	0.017	S	0.270	NS	0.567	NS
ET	15	0.007	S	0.657	NS	0.567	NS

La figura 21 muestra el desarrollo de las concentraciones de carbohidratos en cada uno de los tratamientos, registrando un comportamiento ascendente conforme trascurrían los cultivos, aumentando su concentración en mayor medida en aquellos tratamientos que fueron cultivados a bajas concentraciones de nitrógeno. Dicho en otras palabras se puede decir que el contenido de carbohidratos también se vio afectado por la fase de crecimiento (día) y por el tratamiento en el cual fueron cultivadas las células, los resultados del análisis de varianza indican que existe una interacción fuerte entre la fase de crecimiento (día) y el tratamiento el cual fueron cultivadas las células, las superficies a) y b) de la figura 22, se aprecia la superficie que resulta de la interacción de las dos variables (día y tratamiento) y la función de respuesta (concentración de carbohidratos). En ambas, se puede observar las zonas en donde se encontró la mayor concentración de carbohidratos.

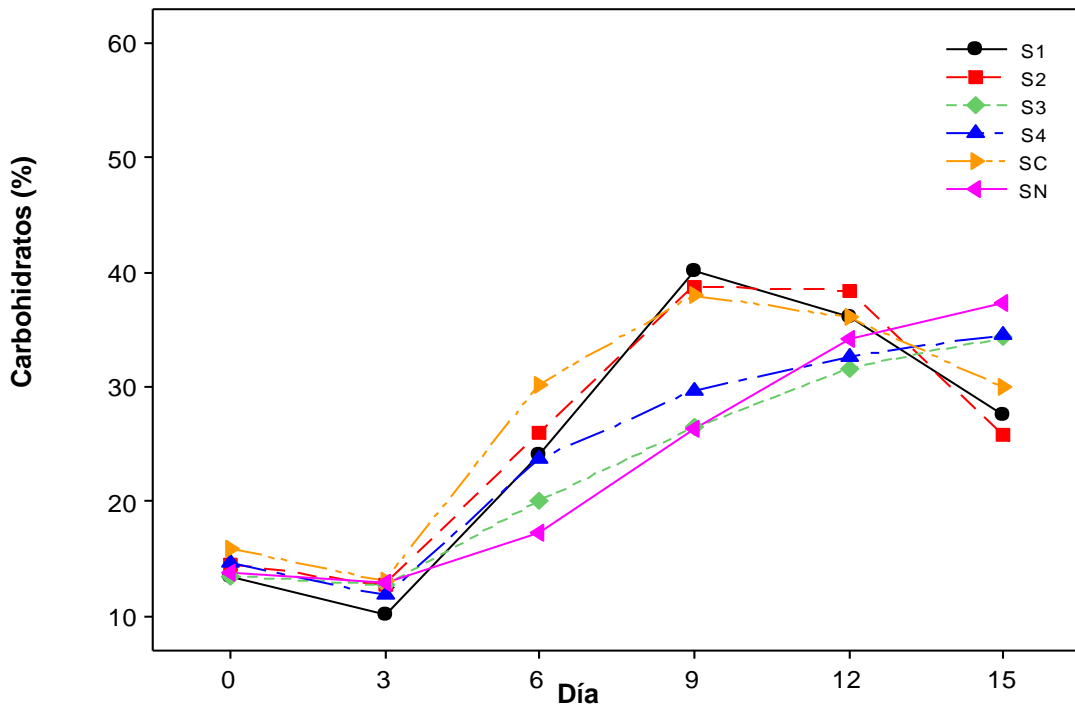


Figura 21. Comparativo del contenido promedio de carbohidratos (%), en cultivos estáticos de *Scenedesmus dimorphus* bajo 6 condiciones de cultivo, (nitrógeno:fósforo): S1 (bajo:bajo), S2 (bajo:alto), S3 (alto:bajo), S4 (alto:alto), SC (0:0), SN (nutrición normal), durante 15 días de cultivo.

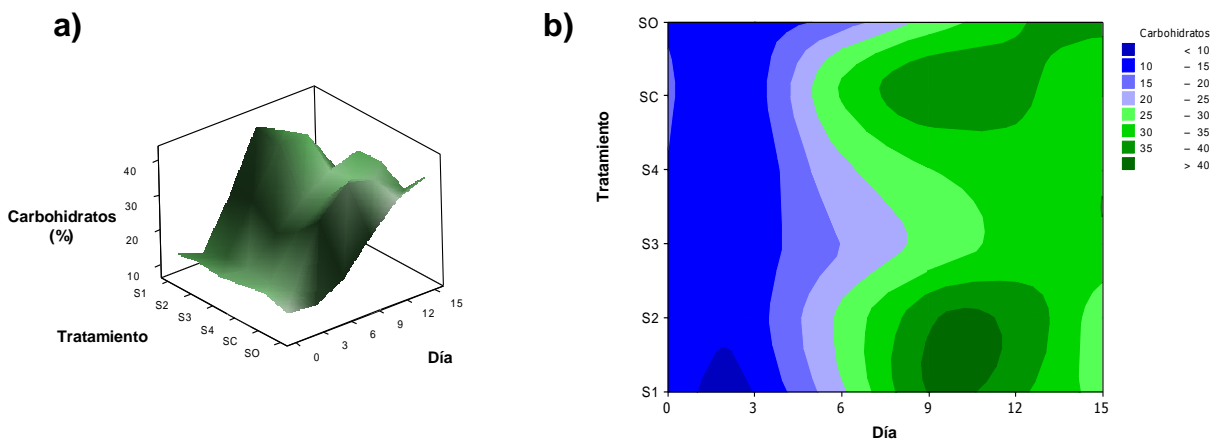


Figura 22. Superficies de respuesta: a) Superficie tridimensional día vs tratamiento y concentración de carbohidratos (%) para los tratamientos S1, S2, S3, S4, SC y SN. b) Contorno de la superficie día vs tratamiento y concentración de carbohidratos (Minitab 15)

Los resultados del análisis de varianza muestra la existencia de diferencias significativas en la concentración de carbohidratos en los días de análisis (día 0, 3, 6 9, 12 y 15). Sin embargo el análisis de comparación múltiple Tukey, exhibió que las máximas concentraciones de carbohidratos se observaron durante la fase estacionaria en los días 9, 12 y 15, con valores de 33.27, 34.86 y 31.61 %, respectivamente, sin mostrar diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, una alternativa sería considerar el noveno día como óptimo, ya que los días 12 y 15 se requerirían mayores días de cultivo, lo cual no es conveniente desde el punto de vista del consumo de energía. Por su parte las mínimas concentraciones de carbohidratos se presentaron al tercer día (12.26 %), sin observarse diferencias significativas respecto al día de la inoculación (día 0).

Pese a las diferencias antes mencionadas, al analizar los resultados del análisis de varianza no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones promedio de carbohidratos de los tratamientos en el cual fue cultivada *Scenedesmus dimorphus*. No obstante, los tratamientos S1, S2 y SC exhibieron las máximas concentraciones de carbohidratos, con valores promedio de 25.26, 26.07 y 27.22 %, respectivamente. No menos importante fueron las concentraciones de los tratamientos S3, S4 y SN, que mostraron las mínimas concentraciones con valores promedio de 23.15, 24.53 y 23.64%, respectivamente (Tabla 15).

Tabla 15. Contenido de carbohidratos promedio (%) durante todo el periodo experimental de *Scenedesmus dimorphus* cultivada bajo 6 condiciones de cultivo (nitrógeno:fósforo): S1 (bajo:bajo), S2 (bajo:alto), S3 (alto:bajo), S4 (alto:alto), SC (0:0), SN (nutrición normal).

Día	Tratamiento						Promedio por día
	S1	S2	S3	S4	SC	SN	
0	13.50 ±0.12	14.51 ±0.55	13.52 ±0.86	14.68 ±0.07	15.85 ±2.26	13.74 ±1.66	14.30 ^a
3	10.17 ±2.88	12.77 ±3.70	12.71 ±1.73	11.81 ±4.64	13.10 ±0.78	12.98 ±2.30	12.26 ^a
6	24.06 ±1.07	26.06 ±0.34	20.11 ±0.78	23.72 ±1.01	30.27 ±1.58	17.26 ±1.11	23.58 ^p
9	40.14 ± 2.58	38.79 ±0.50	26.51 ±0.85	29.72 ±1.82	38.02 ±2.02	26.43 ±1.84	33.27 ^c
12	36.14 ±2.73	38.45 ±1.08	31.68 ±1.67	32.67 ±1.40	36.09 ± 3.08	34.15 ±3.73	34.86 ^c
15	27.54 ±3.40	25.85 ±0.10	34.36 ±2.12	34.58 ±1.12	30.02 ±2.48	37.29 ±3.54	31.61 ^c
Promedio por tratamiento	25.26 ^a	26.07 ^a	23.15 ^a	24.53 ^a	27.22 ^a	23.64 ^a	24.98

7.3. Evaluación cuantitativa de los cultivos de *Chlorella sorokiniana*

7.3.1. Crecimiento algal

Chlorella sorokiniana fue aislada del sedimentador secundario de la planta de tratamiento de aguas de la ciudad de Chihuahua y fue cultivada bajo concentraciones altas de nitrógeno y fósforo (C1), concentraciones bajas de nitrógeno y fósforo (C2), y dos controles: un medio sin nitrógeno y fósforo (CC) y un medio de nutrición normal (CN).

Durante el desarrollo del cultivo el pH se mantuvo entre 7.0 - 7.4 con un promedio de 7.3 ± 0.13 , mientras que la temperatura se mantuvo entre 20 - 25 °C registrando un promedio de 23.7 ± 2.36 .

Los resultados del análisis de varianza muestran la existencia de diferencias significativas entre la densidad celular promedio registrada en los tratamientos C1, C2, CC y CN durante las distintas fases de crecimiento, posteriormente el análisis de comparación múltiple de Tukey muestra que la densidad celular promedio registrada en cada uno de los tratamientos fueron estadísticamente diferentes entre sí sin mostrar alguna igualdad entre tratamientos durante las distintas fases de crecimiento, registrando en todo momento la tendencia CN > C2 > C1 > CC (Tabla 15).

Tabla 15. Densidad celular promedio (cel ml⁻¹) de *Chlorella sorokiniana* cultivada bajo 4 condiciones distintas de cultivo (nitrógeno:fósforo) C1 (bajo:bajo); C2 (alto:alto). Letras iguales pertenecen al mismo grupo, por otro lado, medias con letras diferentes muestran una diferencia significativa entre sí.

Fase	Día	Tratamiento			
		C1	C2	CC	CN
I	0	0.97 ± 0.02 ^a	0.99 ± 0.01 ^a	0.99 ± 0.02 ^a	0.97 ± 0.01 ^a
E	3	13.48 ± 0.99 ^a	14.69 ± 0.85 ^b	5.40 ± 0.07 ^c	15.38 ± 0.06 ^d
E	6	24.49 ± 0.09 ^a	26.37 ± 0.62 ^b	9.02 ± 0.18 ^c	33.03 ± 0.01 ^d
ES	9	29.88 ± 0.01 ^a	37.53 ± 0.07 ^b	10.87 ± 0.82 ^c	52.05 ± 0.09 ^d
ES	12	30.34 ± 0.09 ^a	40.44 ± 0.16 ^b	11.87 ± 0.04 ^c	55.32 ± 0.11 ^d
ET	15	26.14 ± 0.09 ^a	37.99 ± 0.06 ^b	11.32 ± 0.04 ^c	54.55 ± 0.07 ^d

Por lo tanto de los resultados se puede inferir que la concentración de nitrógeno y fósforo suministrada a los tratamientos C1 y C2 afectó el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* incrementando su valor en mayor medida en el tratamiento que contenía altas concentraciones de nitrógeno y fosforo (C2), el crecimiento celular medio de El Crecimiento celular de *Chlorella sorokiniana* cultivada a diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo se observa en la figura 23.

Cada uno de los tratamientos se inicio con una densidad celular de aproximadamente 1×10^6 células ml^{-1} . A partir de ese momento se inicio el crecimiento exponencial, con una duración de 9 días en cada uno de los tratamientos.

El tratamientos C1 inicio la fase estacionaria al séptimo día, la máxima densidad celular se obtuvo al día 13 con un valor promedio de 31.85×10^6 células ml^{-1} , la máxima producción celular se registro durante la fase de crecimiento exponencial (día 5) con un valor de 7.35 células $\text{ml}^{-1}\text{d}^{-1}$, mientras que la mínima producción celular se registró al final del cultivo con un valor negativo de 1.59 células $\text{ml}^{-1}\text{d}^{-1}$. En cuanto a la tasa de crecimiento (μ), el máximo valor se presentó al primer día de cultivo (2.08 dia^{-1}) y este fue descendiendo a medida de que la densidad celular disminuía hasta registrar un valor promedio de 0.01 dia^{-1} (promedio a partir de la fase estacionaria).

Por su parte, el tratamiento C2 presentó el máximo crecimiento celular al doceavo día registrando un valor promedio de 40.44×10^6 células ml^{-1} , la máxima producción celular se encontró al quinto día de haber iniciado el cultivo con un valor promedio de 9.47 células $\text{ml}^{-1}\text{d}^{-1}$, mientras que la mínima producción celular se registro al día 13 con un valor promedio negativo de 2.07 células $\text{ml}^{-1}\text{d}^{-1}$. En lo que respecta a la tasa de crecimiento (μ) presentó su valor máximo durante la fase de crecimiento exponencial (día 1) con un valor promedio de 2.40 dia^{-1} , mostrando una disminución a partir del decimo día.

El tratamiento de nutrición normal (CN), presentó un incremento más acelerado en su densidad celular que el resto de los tratamientos, registrando un máximo valor promedio de 55.94×10^6 células ml^{-1} observado al día 14, la máxima producción celular se presentó al octavo día con un valor promedio de 13.39 células $\text{ml}^{-1}\text{d}^{-1}$, a medida que el cultivo avanzaba la densidad celular también lo hacía así como la también su producción celular, dicho efecto también se observó el tasa de crecimiento (μ), registrando sus mínimos valores durante la fase estacionaria, sin embargo sus máximos valores se registraron durante la fase exponencial (día 1) con un valor promedio de 2.60 dia^{-1} .

El tratamiento control CC, al no contener los principales macronutrientes (nitrógeno y fósforo) su crecimiento fue muy lento, registrando el máximo valor en su densidad celular al decimo día con un valor promedio de 12.54×10^6 células ml^{-1} , la máxima producción celular se registró durante la fase de crecimiento exponencial (día 6) con un valor promedio de 4.44 células $\text{ml}^{-1}\text{d}^{-1}$, en cuanto a la tasa de crecimiento (μ), presentó el máximo de divisiones al primer día de haber iniciado el cultivo registrando un valor promedio de 1.36 día^{-1} , a medida de que el cultivo avanzaba y una vez las células en fase estacionaria (día 10), la tasa de crecimiento empezó a disminuir, finalizando el cultivo con un valor de 0.01 día^{-1} .

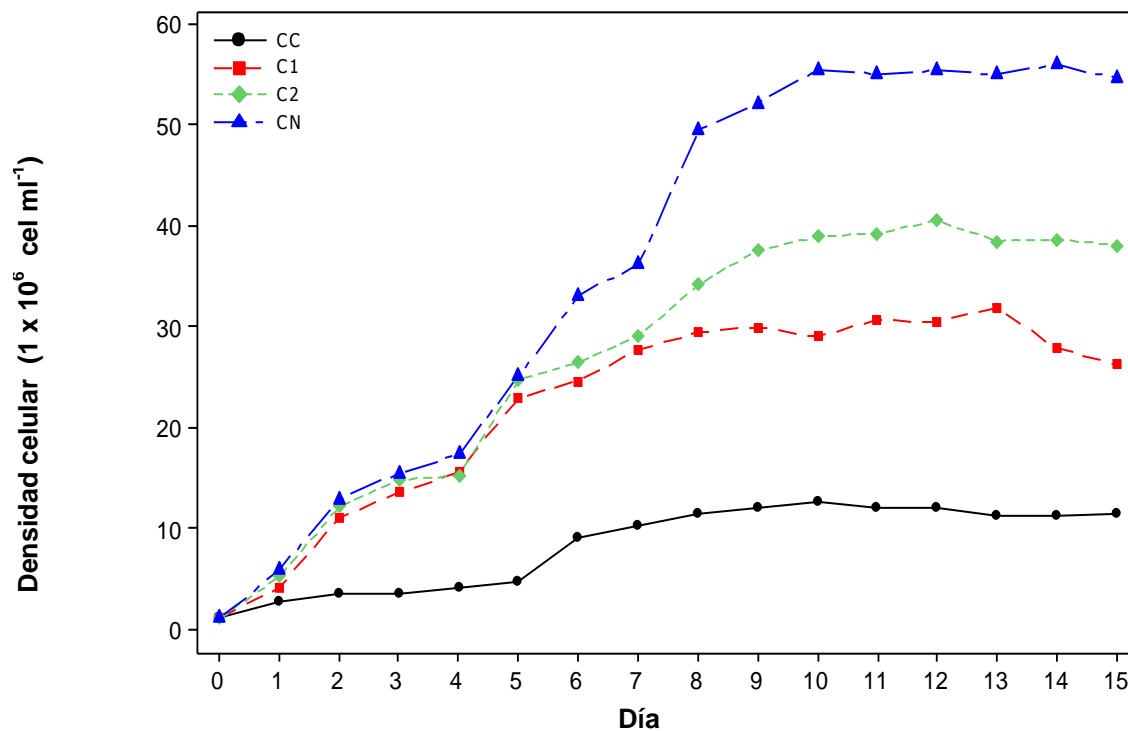


Figura 23. Grafico comparativo del contenido promedio de densidad celular ($\times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$), en cultivos estáticos de *Chlorella sorokiniana* bajo 4 condiciones de cultivo, (nitrógeno:fósforo): C1 (bajo:bajo), C2 (alto:alto), CC (0:0), CN (nutrición normal), durante 15 días de cultivo.

Los resultados del análisis de varianza muestran la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la densidad celular registrada en cada uno de los tratamientos (promedio durante todo el periodo experimental). A pensar de que el tratamiento CN mostró altos valores en su densidad celular respecto a los demás tratamientos, el análisis de comparación múltiple de Tukey muestra que el valor en su densidad celular promedio (36.18×10^6 células ml^{-1}) no mostró diferencias significativas al valor registrado en el tratamiento C2 (27.06×10^6 células ml^{-1}) siendo estos dos estadísticamente iguales. Por su parte, este último, no presentó diferencias significativas al valor promedio registrado en el tratamiento C1 (22.17×10^6 células ml^{-1}). Sin embargo la densidad celular registrada en el tratamiento CC presentó los valores mas bajos en la densidad celular (8.22×10^6 células ml^{-1}), siendo este tratamiento estadísticamente diferente al resto (C1, C2 y CN; Tabla 16).

Las tasas de crecimiento promedio (μ) para *Chlorella sorokiniana* cultivada en los tratamientos C1, C2, CC y CN, no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). Sin embargo se observó una mayor tasa de crecimiento en el tratamiento CN (0.36 día^{-1}), sin embargo, el tratamiento CC registró la menor tasa de crecimiento que el resto de los tratamientos con un valor promedio de 0.22 día^{-1} (promedio durante todo el periodo experimental; Tabla 16)

7.3.1.1. Cuantificación de biomasa

La concentración de biomasa aumentó en función del tiempo y difirió entre tratamientos (Fig. 25), observando la misma tendencia que la densidad celular, incrementándose en mayor medida en aquellos tratamientos que contenían concentraciones altas de nitrógeno (C2 y CN). Dicho en otras palabras, la concentración celular se vio afectada por la fase de crecimiento (día) y el tratamiento en el cual fue cultivada *Chlorella sorokiniana*. Graficas a) y b) de la figura 24, es la proyección de la concentración de biomasa en un plano día contra tratamiento.

De la figura 24b se puede observar con mayor exactitud que los valores promedio máximos de biomasa para los tratamientos C1, C2, CC y CN, fueron: 1.22, 1.62, 0.48 y 2.22 g l⁻¹, observados al día 12 en todos los tratamientos, excepto el tratamiento CC que se presentó al noveno día.

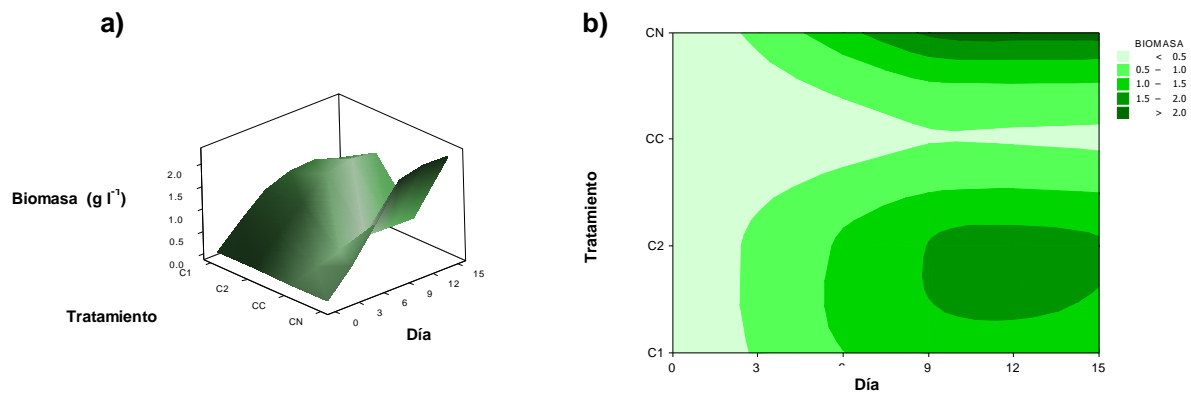


Figura 24. a) Superficie tridimensional de día contra tratamiento y concentración de biomasa (g l⁻¹) para los tratamientos C1, C2, CC y CN. b) Grafico de contorno de la superficie día contra tratamiento y concentración de biomasa (Minitab 15).

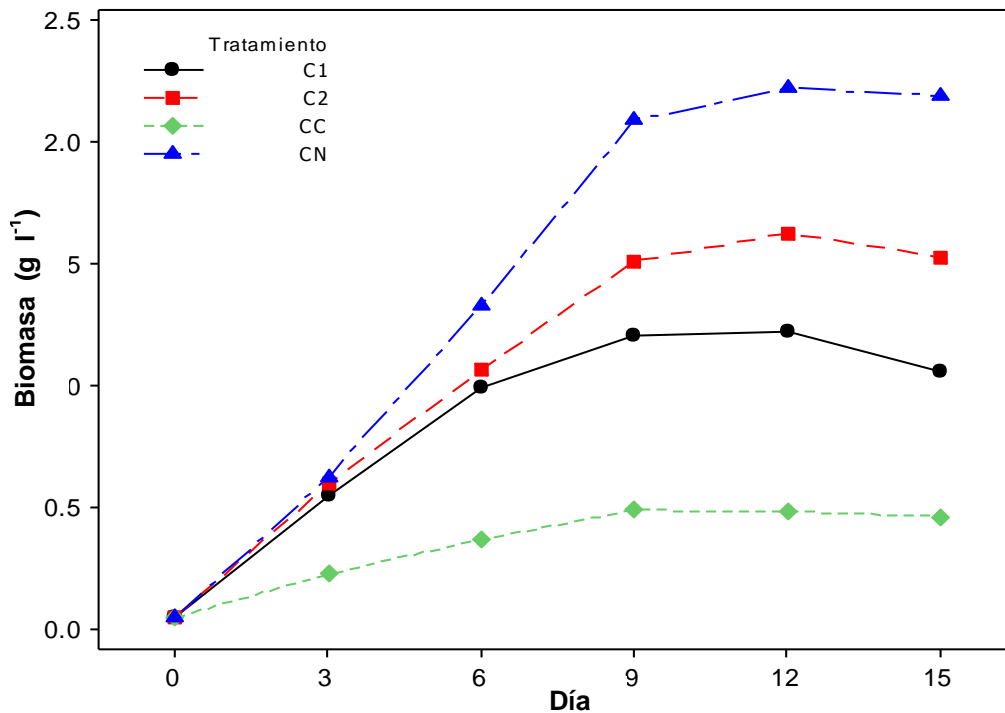


Figura 25. Grafico comparativo del contenido promedio de biomasa (g l^{-1}) en cultivos estáticos de *Chlorella sorokiniana* bajo 4 condiciones de cultivo, (nitrógeno:fósforo): C1 (bajo:bajo), C4 (alto:alto), CC (0:0), CN (nutrición normal), durante 15 días de cultivo.

Los resultados del análisis de varianza muestran la existencia de diferencias significativas entre la concentración de biomasa (promedio durante todo el periodo experimental) entre los tratamientos C1, C2, CC y CN. Posteriormente la prueba de comparación múltiple de Tukey muestra que la concentración promedio de biomasa en los tratamientos C1, C2 y CN no mostraron diferencias significativas en sus medias siendo estadísticamente iguales, registrando valores promedio de 0.84, 1.06 y 1.42 g l^{-1} , respectivamente, mientras que C1 fue el único tratamiento que no mostró diferencias significativas respecto al tratamiento control (CC), registrando un valor promedio de 0.35 g l^{-1} .

Se encontró una correlación positiva entre la densidad óptica del cultivo y la concentración de biomasa de *Chlorella sorokiniana*, por lo que se realizó una línea de estandarización entre ambas variables, por lo tanto la concentración de biomasa para *Chlorella sorokiniana* también puede ser calculada cuantitativamente por medio de la siguiente ecuación: $y = 0.776x + 0.063$; $R^2 = 0.994$ (y: concentración de biomasa; x: densidad óptica A_{680nm}), siendo este un método sencillo y fácil de usar.

7.3.1.2. Producción de biomasa

La máxima producción de biomasa para los tratamientos C1, C2, CC y CN fue de 0.06, 0.17, 0.18 y 0.25 $g\ l^{-1}d^{-1}$, registrándose en todos los tratamientos al tercer día de haber iniciado el cultivo (fase exponencial), excepto el tratamiento CN que se presentó al noveno día. Al finalizar los cultivos se registraron valores inferiores a 0.05 $g\ l^{-1}d^{-1}$ en cada uno de los tratamientos. Los resultados del análisis de varianza muestra la existencia de diferencias significativas entre la productividad de biomasa de cada uno de los tratamientos (promedio durante todo el periodo experimental), posteriormente el análisis de comparación múltiple de Tukey muestra que solo la productividad promedio entre los tratamientos CC y CN fue estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). CN fue el tratamiento que sin duda alguna obtuvo la productividad de biomasa más elevada registrando un valor promedio de 0.12 $g\ l^{-1}d^{-1}$, mientras que CC presentó el valor más bajo de productividad de biomasa con 0.02 $g\ l^{-1}d^{-1}$ (Fig. 26, Tabla 16).

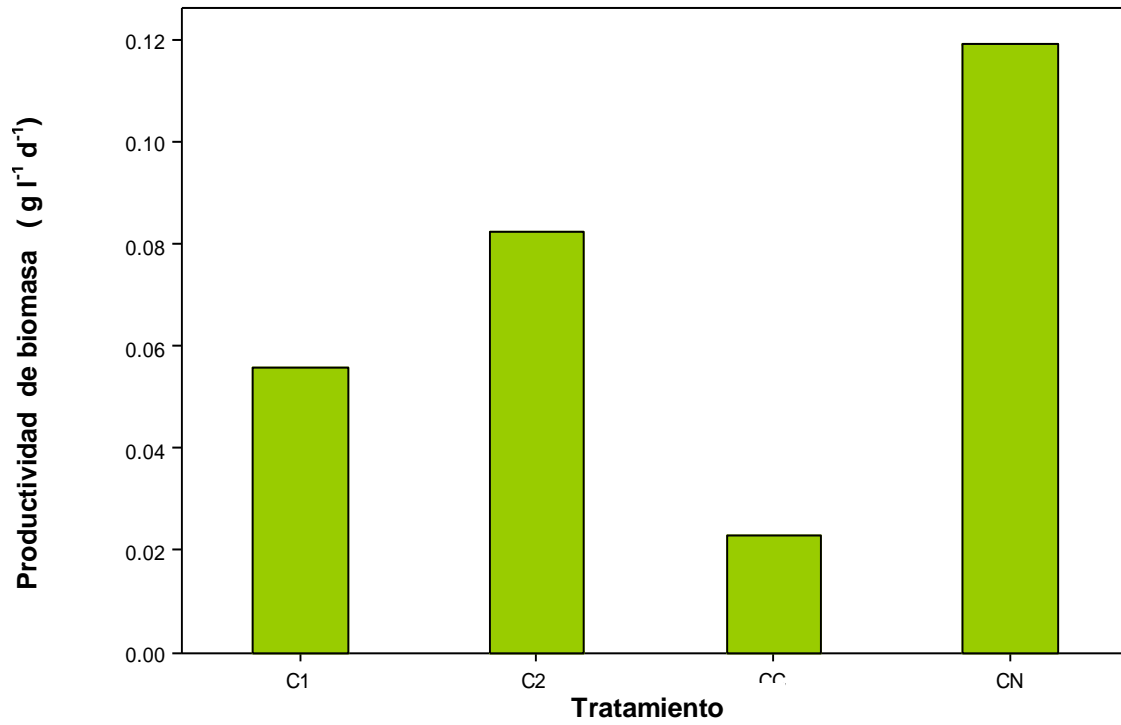


Figura 26. Promedio de producción de biomasa (g l⁻¹d⁻¹) durante todo el periodo experimental en *Chlorella sorokiniana* cultivada bajo 4 condiciones de cultivo, (nitrógeno:fósforo): C1 (bajo:bajo), C4 (alto:alto), CC (0:0), CN (nutrición normal).

Tabla 16. Densidad celular, tasa de crecimiento, concentración de biomasa y producción de biomasa promedio de todo el periodo experimental para *Chlorella sorokiniana* en los tratamientos C1 y c2, además del tratamiento control (CC) y medio de nutrición normal (CN). Letras iguales pertenecen al mismo grupo, por otro lado, medias con letras diferentes muestran una diferencia significativa entre sí (promedio de todo el periodo experimental).

Tratamiento	Concentración celular (x 10 ⁶ células ml ⁻¹)	Tasa de crecimiento (día ⁻¹)	Concentración de biomasa (g l ⁻¹)	Producción de biomasa (g l ⁻¹ d ⁻¹)
C1	22.17 ^a	0.30 ^a	0.84 ^{ab}	0.06 ^{ab}
C2	27.06 ^{ab}	0.33 ^a	1.06 ^b	0.08 ^{ab}
CC	8.22 ^c	0.22 ^a	0.35 ^a	0.02 ^a
CN	36.18 ^d	0.36 ^a	1.42 ^b	0.12 ^d

7.4. Composición química de la biomasa de *Chlorella sorokiniana*

7.4.1. Lípidos totales

El contenido de lípidos en las células que se utilizaron como inóculo fue de aproximadamente 12.42 % en base al peso seco, para cada uno de los tratamientos.

Durante el desarrollo del cultivo el contenido de lípidos en los tratamientos C1, C2, CC y CN mostró un comportamiento ascendente (Fig. 28), sin embargo, cuando los cultivos se encontraban en fase de crecimiento exponencial (día 3) disminuyó ligeramente su contenido en todos los tratamientos, sin embargo, al sexto día se registró un ligero pero no significante aumento en el contenido de lípidos llegando a un valor promedio de 15.07 % en cada uno de los tratamientos. Cuando los cultivos iniciaban la fase estacionaria (día 9) el contenido de lípidos mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) en todos los tratamientos, registrando valores promedio de 21.60, 22.46, 25.05, 21.33 % en C1, C2, CC y CN, respectivamente, sin mostrar diferencias significativas entre

ellos ($p > 0.05$). A partir del noveno día (inicio de la fase estacionaria) hasta el final del cultivo (fase estacionaria tardía) el contenido de lípidos en todos los tratamientos no mostraron aumento significativo alguno, finalizando el cultivo con un contenido de lípidos de 25.46, 25.61, 21.28, 24.76 % para los tratamientos C1, C2, CC y CN, respectivamente, sin mostrar diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el contenido de lípidos de cada uno de los tratamientos a este día (Fig. 27, Tabla 17).

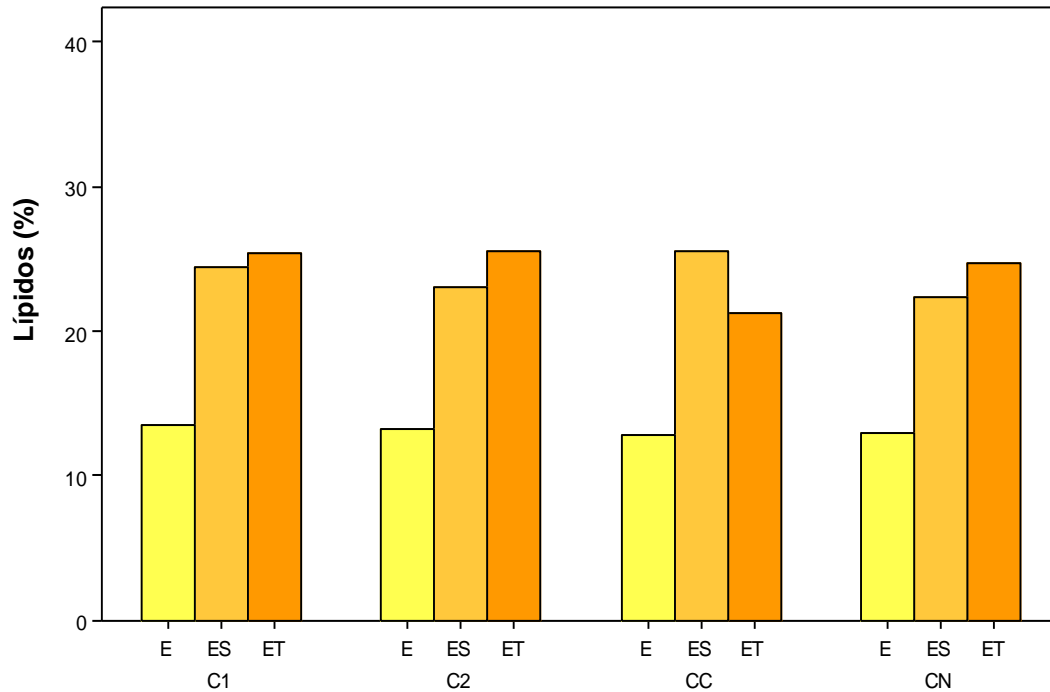


Figura 27. El contenido promedio de lípidos (%) registrado durante las distintas fases de crecimiento de *Chlorella sorokiniana* durante un periodo de cultivo de 15 días. E: fase exponencial (día 3-6); ES: fase estacionaria (día 9-12); ET: fase estacionaria tardía (día 15).

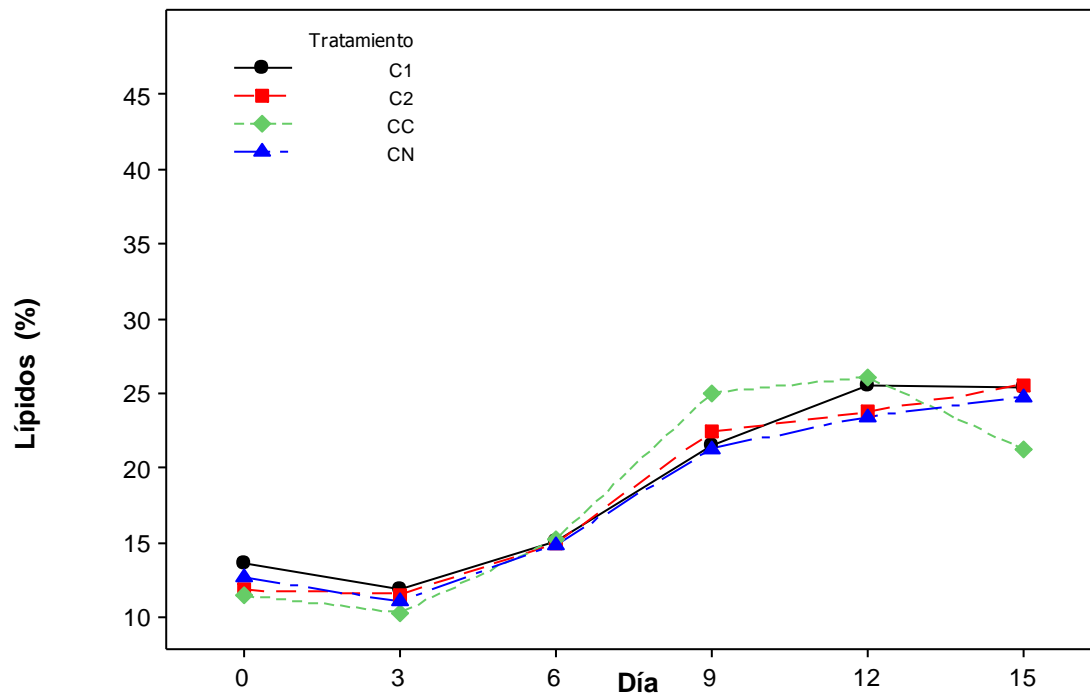


Figura 28. Grafico comparativo del contenido promedio de lípidos (%), en cultivos estáticos de *Chlorella sorokiniana* bajo 4 condiciones de cultivo, (nitrógeno:fósforo): C1 (bajo:bajo), C2 (alto:alto), CC (0:0), CN (nutrición normal), durante 15 días de cultivo.

Por lo tanto, resultados del análisis de varianza muestran que el contenido de lípidos no se vio afectado por el tratamiento en el cual fue cultivada *Chlorella sorokiniana*, pero sí por día en el cual fueron cosechadas las células (fase de crecimiento), sin alguna interacción significativa entre estas dos variables. A pesar de que el contenido de lípidos no se vio afectado por el tratamiento, los máximos valores de lípidos se registraron en los tratamientos CC y C1 (26.11 y 25.46 %), los días que registraron el mayor contenido de lípidos fueron 9, 12 y 15 (fase estacionaria), sin mostrar diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$), en cambio, los mínimos valores se registraron durante la fase exponencial (día 3). Los gráficos a) y b) de la figura 29 se puede apreciar en qué día y tratamiento se observó el mayor contenido lipídico.

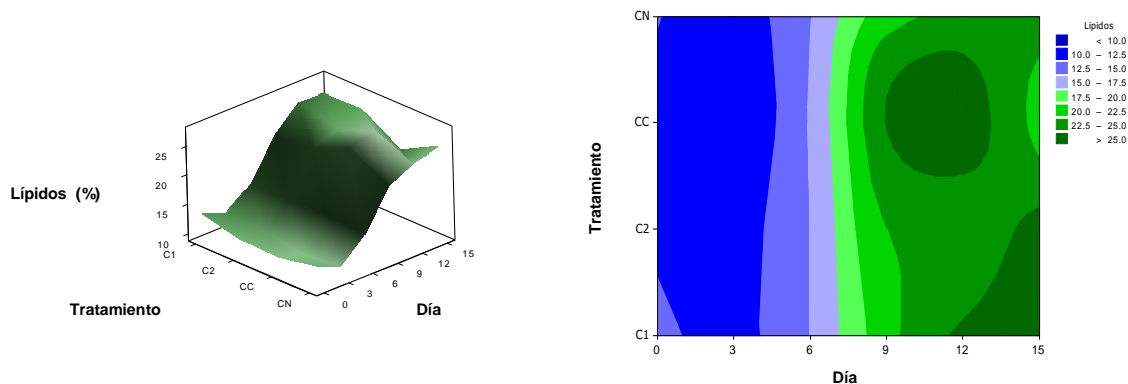


Figura 29. a) Superficie tridimensional de día contra tratamiento y concentración de lípidos (%) para los tratamientos C1, C2, CC y CN. b) Grafico de contorno de la superficie día contra tratamiento y concentración de biomasa (Minitab 15).

Tabla 17. Contenido de lípidos promedio (%) durante todo el periodo experimental de *Chlorella sorokiniana* cultivada bajo 4 condiciones de cultivo (nitrógeno:fósforo): C1 (bajo:bajo), C2 (alto:alto), CC (0:0), CN (nutrición normal). Letras iguales pertenecen al mismo grupo, por otro lado, medias con letras diferentes muestran una diferencia significativa entre sí (promedio de todo el periodo experimental).

Día	Tratamiento				Promedio por día
	C1	C2	CC	CN	
0	13.60 ± 0.85	11.88 ± 0.88	11.50 ± 2.12	12.70 ± 1.27	12.42 ^a
3	11.86 ± 1.00	11.58 ± 0.92	10.36 ± 0.91	11.10 ± 0.28	11.22 ^a
6	15.07 ± 1.31	15.02 ± 1.90	15.25 ± 1.41	14.92 ± 2.51	15.07 ^b
9	21.60 ± 0.82	22.46 ± 3.32	25.05 ± 3.11	21.33 ± 1.23	22.61 ^c
12	25.52 ± 0.45	23.79 ± 2.21	26.11 ± 1.60	23.48 ± 0.00	24.72 ^c
15	25.46 ± 1.37	25.61 ± 1.38	21.28 ± 1.02	24.76 ± 1.67	24.28 ^c
Promedio por tratamiento	18.85 ^a	18.39 ^a	18.26 ^a	18.05 ^a	18.40

Para observar el efecto de la concentración de nitrógeno y fósforo en la acumulación de lípidos de *Chlorella sorokiniana* en los tratamientos C1 y C2 se realizó una prueba t (student) para comparar sus medias.

Los resultados demuestran que el contenido de lípidos no se vio afectado por la concentración de nitrógeno y fósforo durante las distintas fases de crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en los tratamientos C1 y C2. Dicho en otras palabras, cuando *Chlorella sorokiniana* fue cultivada en condiciones limitantes de nitrógeno y fósforo (C1) se comportó de la misma manera que cuando las células que fueron cultivadas bajo condiciones suficientes de nitrógeno y fósforo (C2), sin provocar una inducción significativa en el contenido de lípidos en ambos tratamientos (Fig. 30).

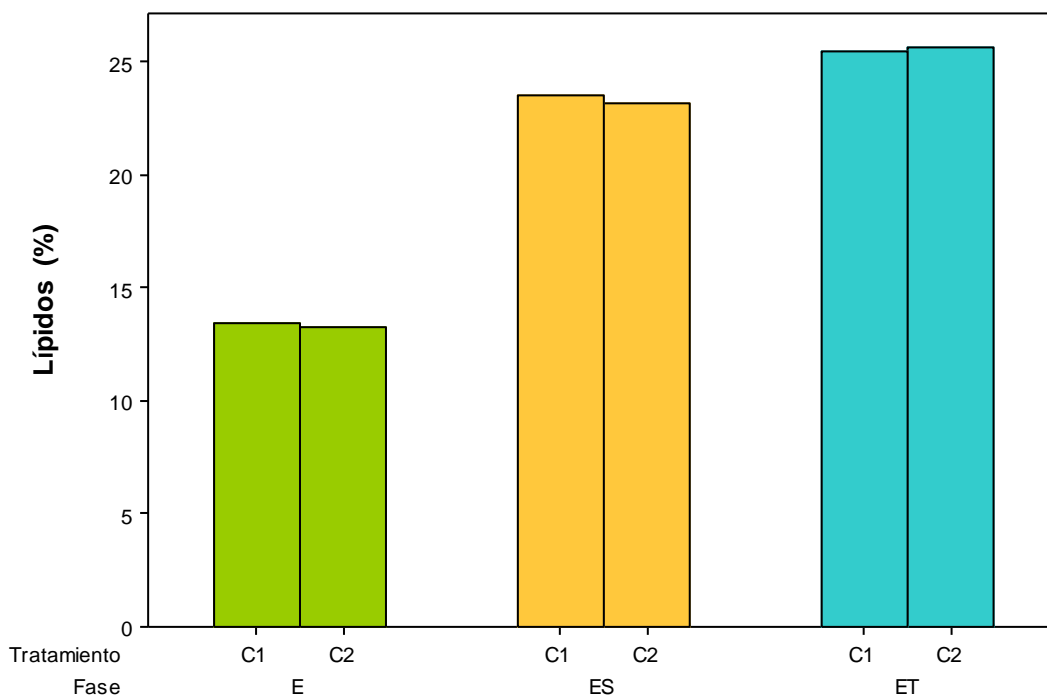
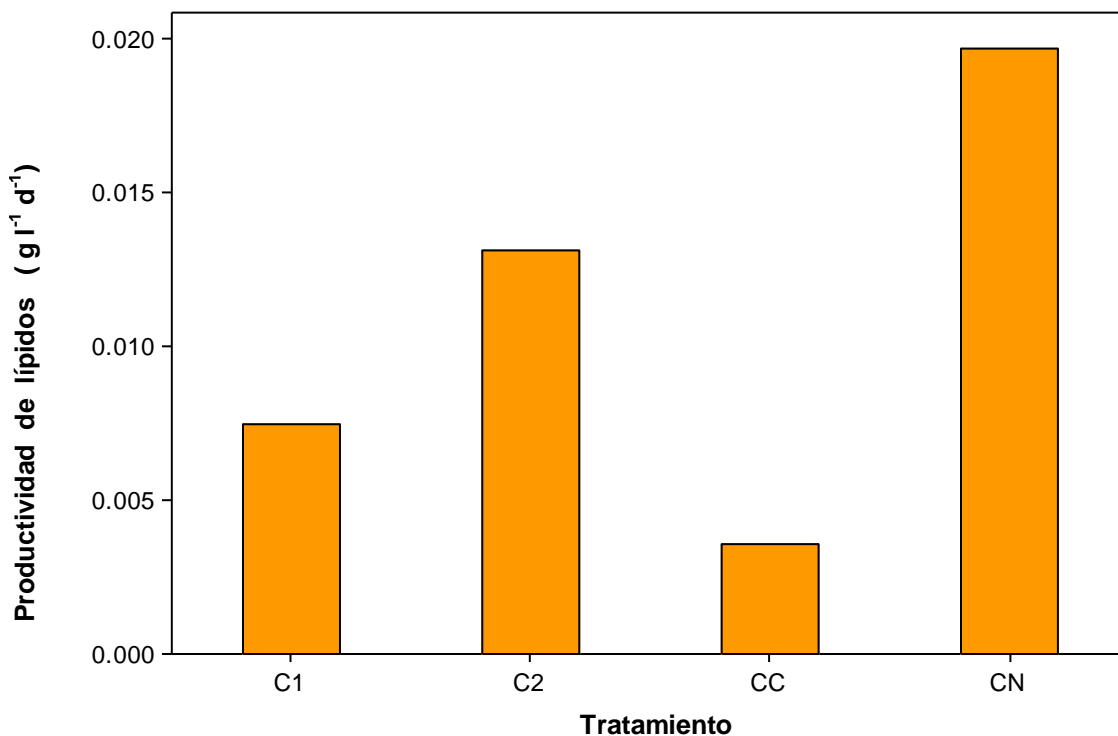


Figura 30. Contenido promedio de lípidos (%) de las células de *Chlorella sorokiniana* cultivada bajo 2 condiciones de cultivo (nitrógeno:fósforo) : C1 (bajo:bajo), C2 (alto:alto), durante las distintas fases de crecimiento: E:fase exponencial; ES: fase estacionaria; ET: fase estacionaria tardía.

7.4.1.1. Producción de lípidos

Debido a la baja productividad de biomasa registrada en los tratamientos C1 y CC (Fig. 26) presentaron los niveles más bajos de producción de lípidos con valores promedio durante todo el periodo experimental de 0.007 y 0.003 $\text{g l}^{-1}\text{d}^{-1}$, respectivamente. Sin embargo, debido a las elevadas concentraciones de nutrientes que constituyen a los tratamientos C2 y CN, exhibió una mayor productividad de biomasa, es por ello que dichos tratamientos registraron una mayor producción de lípidos, con valores promedio de 0.013 y 0.019 $\text{g l}^{-1}\text{d}^{-1}$, respectivamente. (Fig. 31).

Los valores máximos en cuanto a productividad de lípidos se refiere se presentaron en todos los tratamientos al noveno día, con valores máximos promedio de 0.022, 0.033, 0.01, 0.054 en los tratamientos C1, C2, CC y CN, respectivamente.



31. Productividad de lípidos promedio ($\text{g l}^{-1}\text{d}^{-1}$) durante todo el periodo experimental de *Chlorella sorokiniana* cultivada bajo 4 diferentes condiciones de cultivo (nitrógeno:fósforo): C1 (bajo:bajo), C2 (alto:alto), CC (0:0), CN (nutrición normal).

7.4.1.2. Análisis lipídico

La acumulación de lípidos neutros de *Chlorella sorokiniana* se determinó por medio del método de rojo nilo. Los resultados demostraron que la fluorescencia más alta y por lo tanto el contenido de lípidos neutros más abundante en las células de *Chlorella sorokiniana* se registró durante la fase estacionaria tardía en los tratamientos C1, C2 y CN, sin mostrar diferencias significativas ($p > 0.050$), mientras que los valores más altos de fluorescencia para el tratamiento CC se registraron durante la fase estacionaria, mostrando diferencias significativas con los valores de fluorescencia registrados en fase exponencial. Sin embargo, los valores más bajos de fluorescencia para cada uno de los tratamientos se presentaron durante la fase de crecimiento exponencial (Fig. 32a).

Los resultados del análisis de varianza muestra la inexistencia de diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los valores de fluorescencia registrados para cada uno de los tratamientos durante el desarrollo experimental. Por lo tanto, de los resultados se puede inferir que no existió una inducción de lípidos neutros por limitación y/o deficiencia de nutrientes para *Chlorella sorokiniana* ya que no se registraron diferencias significativas entre los valores de fluorescencia de cada uno de los tratamientos durante el periodo experimental, mostrando un promedio de aproximadamente 110 RFU en todos los tratamientos (Fig. 32b)

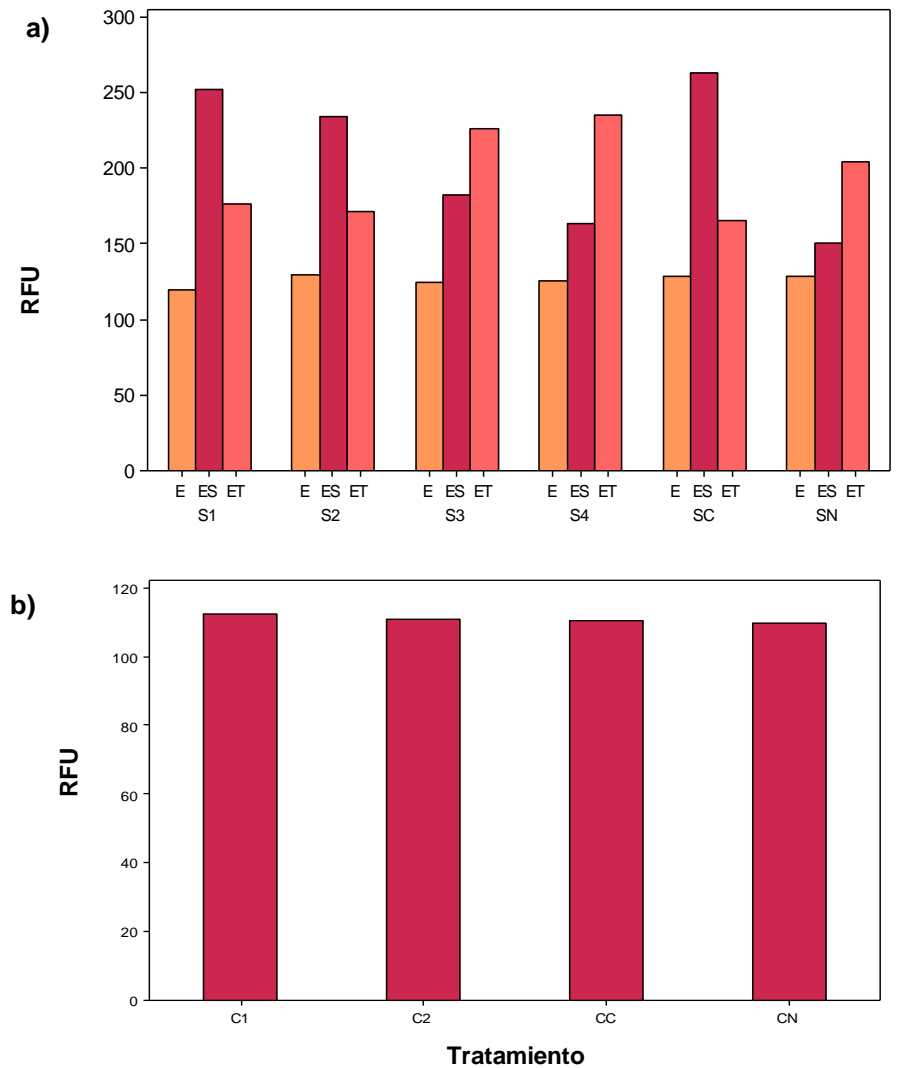


Figura 32. Medición de lípidos neutros de *Chlorella sorokiniana* utilizando una solución fluorescente rojo nilo cultivada bajo 4 diferentes condiciones de cultivo (nitrógeno:fósforo): C1 (bajo:bajo), C2 (alto:alto), CC (0:0), SN (nutrición normal). a): lípidos neutros para cada tratamiento por fase de crecimiento, b) lípidos neutros promedio por tratamiento durante todo el periodo experimental. (promedio de todo el desarrollo experimental).

La intensidad de fluorescencia relativa del rojo nilo se comparó con el rendimiento gravimétrico del total de lípidos celulares. Se obtuvo una ecuación de regresión que indica que la intensidad de fluorescencia se correlaciona linealmente con el contenido de lípidos totales que se determinaron gravimétricamente:

$$y = 3.306x + 53.22$$

Donde y : contenido de lípidos totales determinado gravimétricamente; x : valor relativo de fluorescencia a 580 nm a 10^6 células tenidas con solución rojo nilo, $R^2 = 0.985$.

7.4.2. Proteínas totales

El contenido de proteínas en base al peso seco en las células que se utilizaron como inóculo registró un contenido promedio de aproximadamente 55.06 % en cada uno de los tratamientos. Durante el desarrollo del cultivo el contenido de proteínas mostró un comportamiento descendente en función del tiempo (Fig.34), sin embargo en todos los tratamientos se presentó un ligero aumento en su contenido al inicio de la fase exponencial (día 3) registrando un promedio de aproximadamente 64.97 % para cada tratamiento. A partir del tercer día, el contenido de proteína empezó a disminuir, finalizando la fase estacionaria (día 6) con un promedio de proteínas de 57.42, 49.54, 52.11, 54.84 % para los tratamientos C1, C2, CC y CN, respectivamente.

El contenido de proteína total durante toda la fase exponencial (día 3-6) para los tratamientos C1, C2, CC y CN fue de 55.71, 62.57, 60.81 y 57.81 %, respectivamente, sin mostrar diferencias significativas entre dichos valores ($p > 0.05$), (Fig. 33)

Sin embargo cuando los cultivos se encontraban al inicio de la fase estacionaria (día 9) el contenido de proteínas disminuyó casi un 63% en los tratamientos C1 y CC con valores promedio de 24.54 y 25.12 %, respectivamente. Mientras que en los tratamientos C2 y CN se registró una disminución solamente del 31 % (a partir de la

fase exponencial) con valores promedio de 42.62 y 47.12 %, respectivamente. El contenido de proteína total a lo largo de toda la fase estacionaria (día 9-12) para los tratamientos C1, C2, CC y CN fue de 20.59, 41.76, 20.91 y 44.49 %, respectivamente.

El comportamiento del contenido de proteínas disminuyó en función del tiempo, es por ello que las mínimas concentraciones se presentaron durante la fase estacionaria tardía (día 15), registrando valores promedio de 14.71, 33.90, 13.70 y 36.97 %, respectivamente (Fig. 33).

A partir del día 9, cuando los cultivos iniciaban la fase estacionaria, el contenido de proteína fue superior en los tratamientos que contenían altas concentraciones de nitrógeno (C2 y CN), mientras que los tratamientos C1 y CC, registraron las concentraciones más bajas de proteínas, sin observarse diferencias significativas entre sus valores durante todo el desarrollo del cultivo ($p > 0.05$).

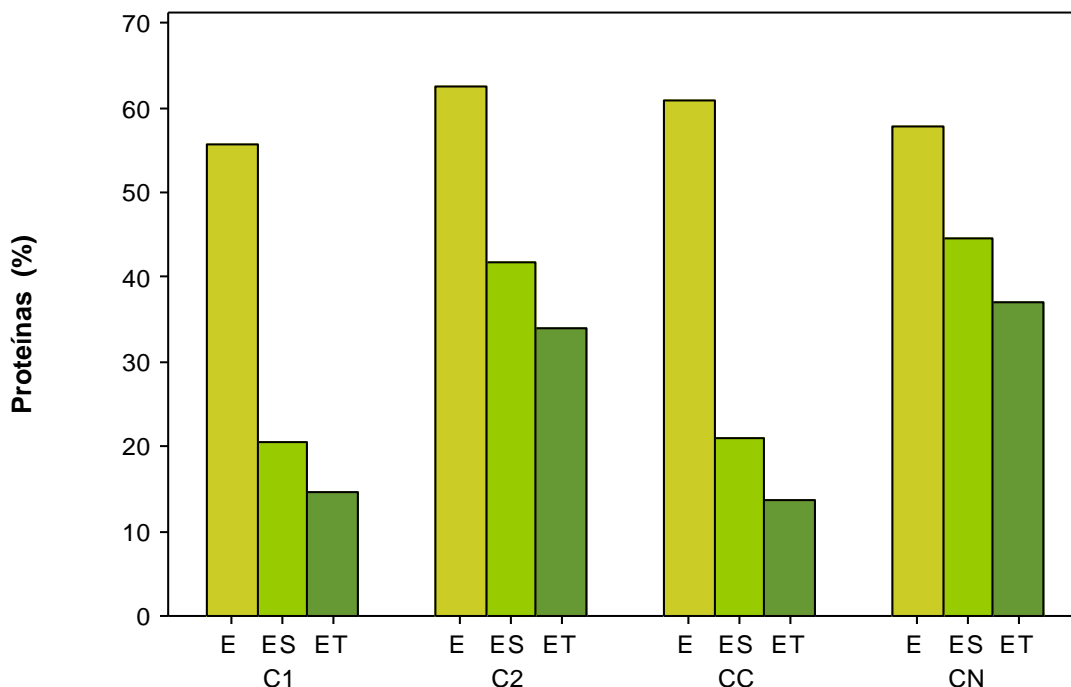


Figura 33. El contenido promedio de proteínas (%) registrado durante las distintas fases de crecimiento de *Chlorella sorokiniana* durante un periodo de cultivo de 15 días. E: fase exponencial (día 3-6); ES: fase estacionaria (día 9-12); ET: fase estacionaria tardía (día 15).

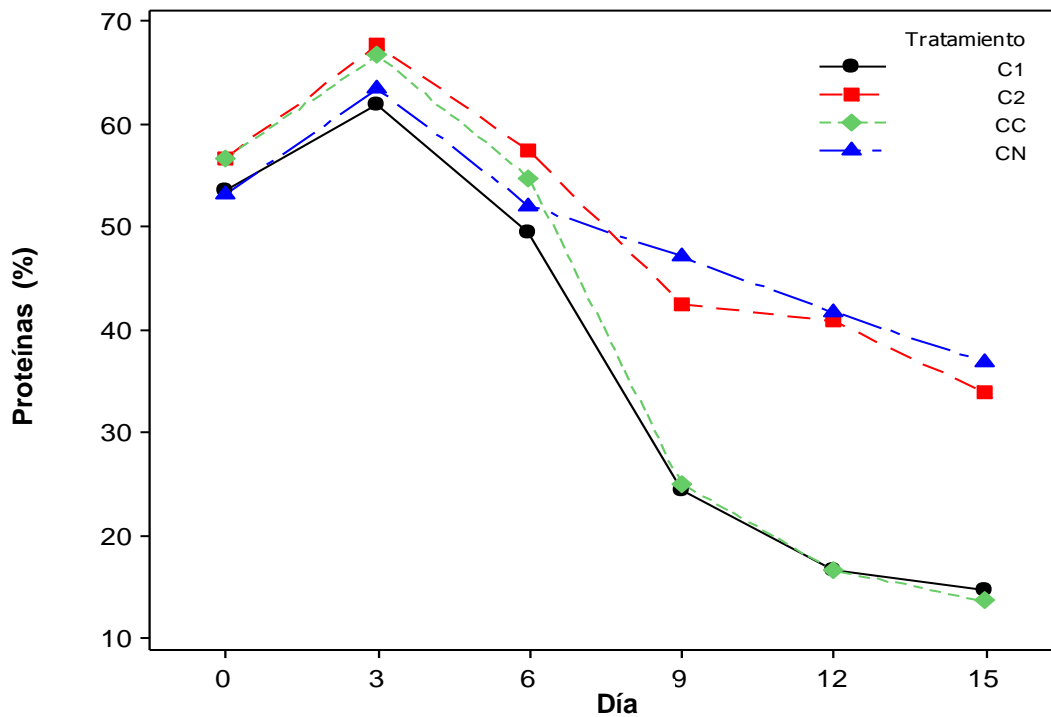


Figura 34. Grafico comparativo del contenido promedio de proteínas (%), en cultivos estáticos de *Chlorella sorokiniana* bajo 4 condiciones de cultivo, (nitrógeno:fósforo): C1 (bajo:bajo), C2 (alto:alto), CC (0:0), CN (nutrición normal), durante 15 días de cultivo.

Los resultados del análisis de varianza muestran que el contenido de proteínas se vio afectado tanto por el tratamiento donde fue cultivada *Chlorella sorokiniana* y por la fase de crecimiento que fueron cosechadas las células, con una interacción significativa entre estas dos variables. Los gráficos a) y b) de la figura 35 se aprecia la superficie de interacción entre el día y tratamiento, donde se puede apreciar con mayor precisión en que tratamiento y en que día se encontró el mayor contenido de proteínas.

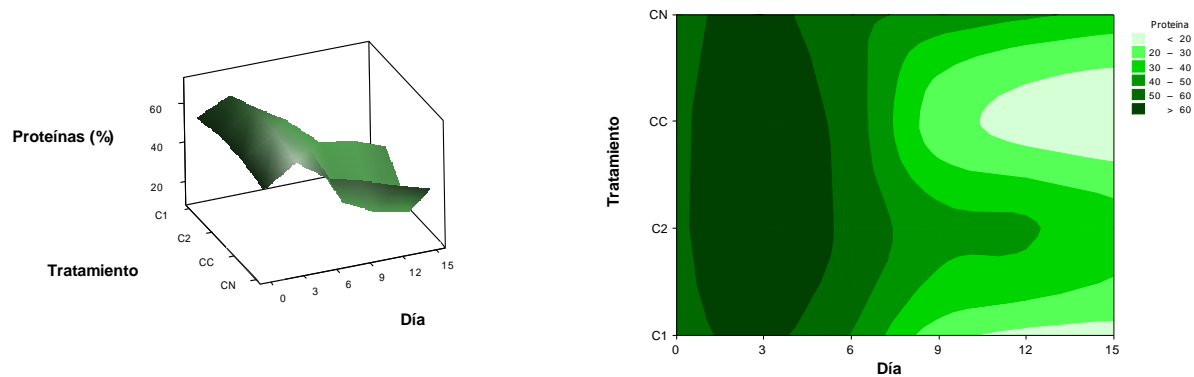


Figura 35. a) Superficie tridimensional de día contra tratamiento y concentración de proteínas (%) para los tratamientos C1, C2, CC y CN. b) Grafico de contorno de la superficie día contra tratamiento y concentración de biomasa (Minitab 15).

El análisis de varianza muestra que el contenido de proteína fue superior en todo momento en los tratamientos C2 y CN, registrando un valor promedio de 49.88 y 49.13 %, respectivamente (promedio durante todo el periodo experimental), sin mostrar diferencias significativas entre ellos, mientras que los mínimos valores se registraron en los tratamientos C1 y CC con valores promedio de 36.82 y 38.96 %, respectivamente, siendo estos últimos estadísticamente iguales ($p > 0.05$), (Tabla 18).

En lo que respecta a los días, se puede inferir que los máximos valores se registraron al tercer día, durante la fase de crecimiento exponencial, con un valor promedio por tratamiento de 64.97 %, mientras que el día en que se registró el menor contenido de proteínas fue al final de los cultivos, durante la fase estacionaria tardía con un valor promedio total de 24.82 %.

La concentración de nitrógeno y fósforo en los tratamientos C1 y C2, afectó de manera significativa el contenido de proteínas, los resultados de la prueba de t (student), confirman lo antes mencionado, encontrándose diferencias significativas y un mayor contenido durante todas las fases de crecimiento en el tratamiento C2, excepto en la fase exponencial, la cual el contenido de proteínas en ambos tratamientos no mostró diferencias significativas entre sus valores (Fig.36)

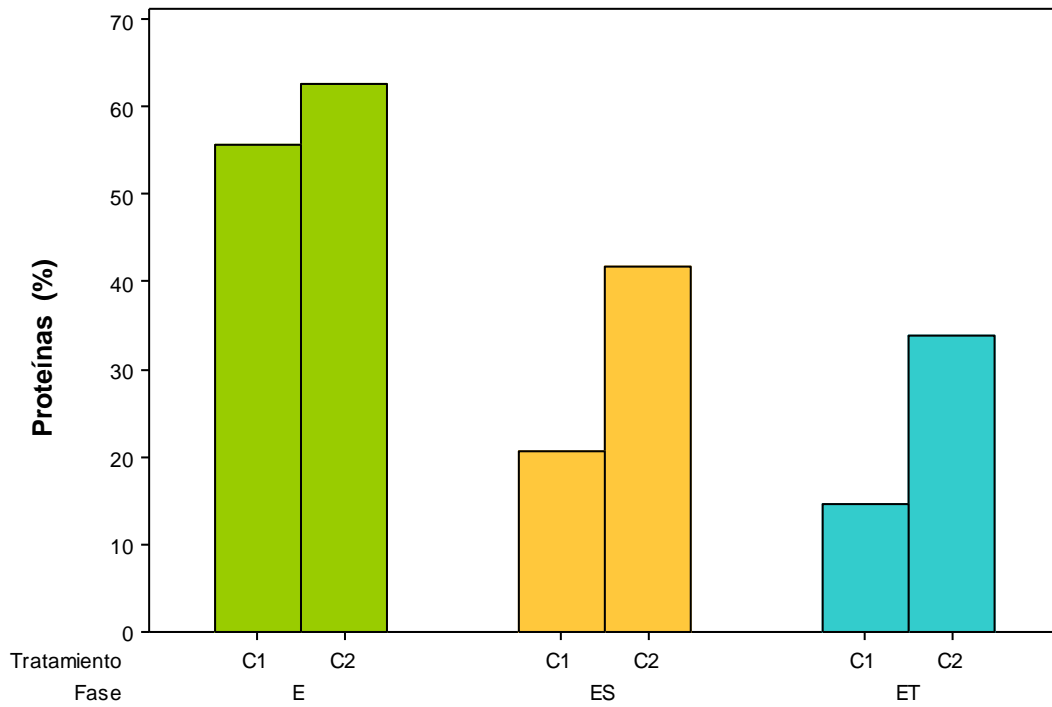


Figura 36. Contenido promedio de proteínas (%) de las células de *Chlorella sorokiniana* cultivada bajo 2 condiciones de cultivo (nitrógeno:fósforo) : C1 (bajo:bajo), C2 (alto:alto), durante las distintas fases de crecimiento: E:fase exponencial; ES: fase estacionaria; ET: fase estacionaria tardía.

Tabla 18. Contenido de proteínas promedio (%) durante todo el periodo experimental de *Scenedesmus dimorphus* cultivada bajo 6 condiciones de cultivo (nitrógeno:fósforo): C1 (bajo:bajo), C2 (alto:alto), CC (0:0), CN (nutrición normal). Letras iguales pertenecen al mismo grupo, por otro lado, medias con letras diferentes muestran una diferencia significativa entre sí (promedio de todo el periodo experimental).

Día	Tratamiento				Promedio por día
	C1	C2	CC	CN	
0	53.59 ± 0.83	56.74 ± 1.29	56.65 ± 1.22	53.25 ± 4.24	55.06 ^a
3	61.88 ± 5.79	67.73 ± 1.84	66.77 ± 3.65	63.50 ± 4.24	64.97 ^a
6	48.04 ± 3.01	57.42 ± 0.71	54.84 ± 1.29	52.11 ± 3.02	53.48 ^a
9	24.54 ± 1.94	42.62 ± 3.68	25.12 ± 2.23	47.21 ± 2.23	34.87 ^c
12	16.64 ± 3.32	40.91 ± 5.35	16.70 ± 3.18	41.76 ± 1.96	29.00 ^c
15	14.71 ± 2.60	33.90 ± 2.51	13.70 ± 2.97	36.97 ± 2.12	24.82 ^c
Promedio por tratamiento	36.57 ^a	49.88 ^b	38.96 ^a	49.13 ^b	43.64

7.4.3. Carbohidratos totales

El contenido de carbohidratos en las células que se utilizaron como inóculo fue aproximadamente de 15.45 % en cada uno de los tratamientos. Durante el desarrollo de cultivo, el contenido de carbohidratos en los tratamientos C1, C2, CC y CN mostró un comportamiento ascendente en función del tiempo (Fig. 38), sin embargo, cuando los cultivos se encontraban en fase de crecimiento exponencial (día 3) el contenido de carbohidratos mostró una ligera disminución en todos los tratamientos, registrando un valor promedio de aproximadamente 10.92 %. A partir del tercer día de haber iniciado los cultivos, el contenido de carbohidratos empezó a aumentar de una manera más significativa en los tratamientos C1 y CC, registrando un valor promedio de 33.02 y 35.19 %, respectivamente, mientras que en el resto de los tratamientos (C2 y CN) fue de 23.46, 22.81 %, respectivamente. El contenido de carbohidratos total durante toda la

fase exponencial (día 3-6) fue de 22.03, 17.06, 23.01 y 16.99 % para los tratamientos C1, C2, CC y CN, respectivamente, sin mostrar diferencias significativas en sus medias ($p > 0.05$) (Fig. 37).

No fue sino hasta el inicio de la fase estacionaria (día 9) que se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, el análisis de comparación múltiple de Tukey muestra que el comportamiento en el contenido de carbohidratos en los tratamientos C1 y CC fue significativamente superior y diferente a los valores registrados en los tratamientos C2 y CN. Al final de la fase estacionaria (día 12) el contenido de carbohidratos se incremento nuevamente en todos los tratamientos, sin embargo, dicho aumento no fue significativo en los tratamientos C2 y CN logrando un valor promedio de 25.07 y 25.13 %, respectivamente. En cambio, durante esta fase el contenido de carbohidratos en los tratamientos C1 y CC mostraron su máximo valor durante todo el periodo experimental registrando valores promedio de 62.02 y 62.09 % respectivamente (Fig. 38).

El promedio total durante toda la fase estacionaria (día 9-12) para los tratamientos C1, C2, CC y CN fue de 56.93, 29.60, 59.53 y 29.10 % respectivamente (Fig. 37)

Sin embargo durante la fase estacionaria tardía (día 15) el contenido de carbohidratos en los tratamientos C1 y CC disminuyó llegando hasta un valor promedio de 38.20 y 42.72 %, respectivamente. Mientras que el contenido de carbohidratos en los tratamientos C2 y CN lograron su concentración máxima durante todo el periodo experimental logrando valores promedio de 47.18 y 42.77 %, respectivamente (Fig. 37, 38).

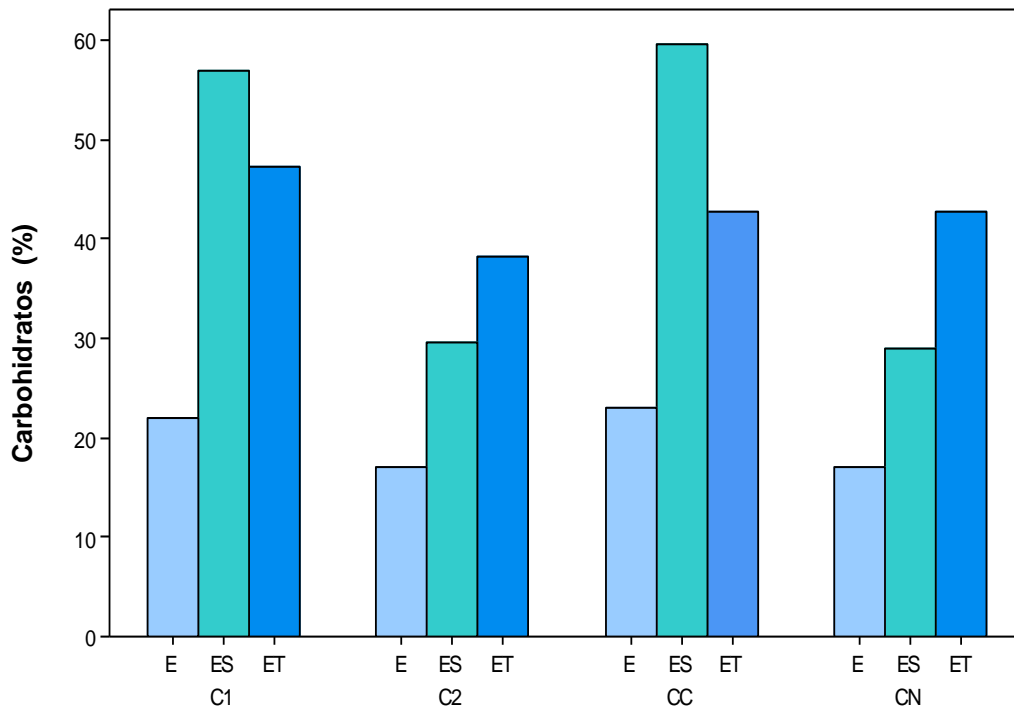


Figura 37. El contenido promedio de carbohidratos (%) registrado durante las distintas fases de crecimiento de *Chlorella sorokiniana* durante un periodo de cultivo de 15 días. E: fase exponencial (día 3-6); ES: fase estacionaria (día 9-12); ET: fase estacionaria tardía (día 15).

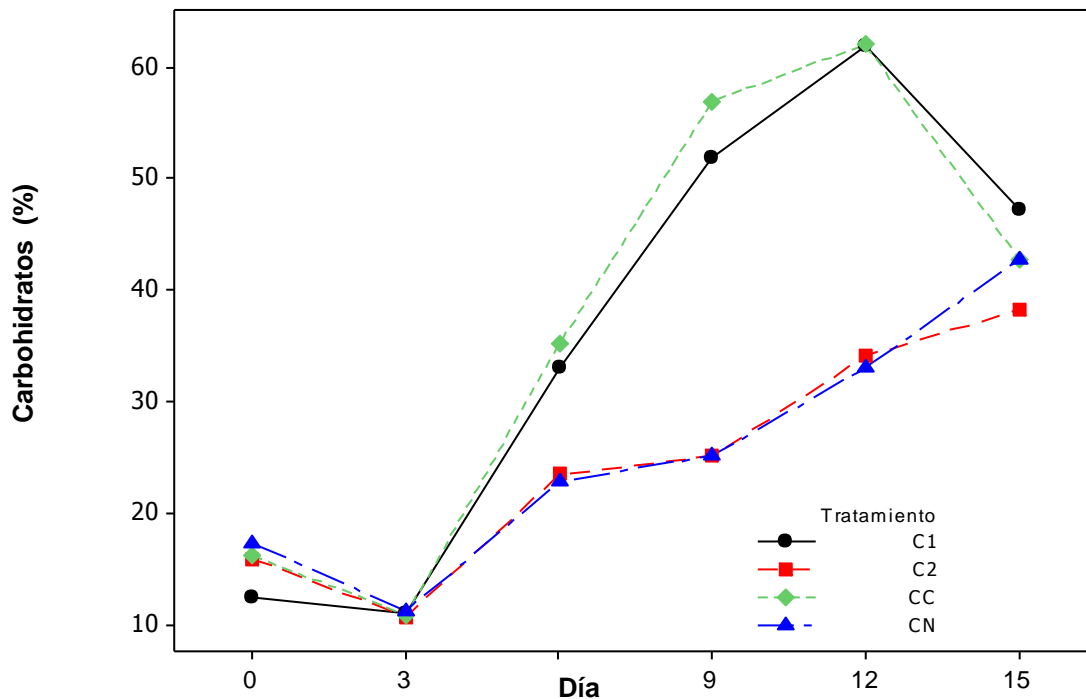


Figura 38. Grafico comparativo del contenido promedio de carbohidratos (%), en cultivos estáticos de *Chlorella sorokiniana* bajo 4 condiciones de cultivo, (nitrógeno:fósforo): C1 (bajo:bajo), C2 (alto:alto), CC (0:0), CN (nutrición normal), durante 15 días de cultivo.

Los resultados del análisis de varianza muestran que el contenido de carbohidratos se vio afectado por el tratamiento en el cual fue cultivada *Chlorella sorokiniana* ($p < 0.05$) y el día en que fueron cosechadas las células (fase de crecimiento) ($p < 0.05$), con una interacción significativa entre estas dos variables ($p < 0.05$). Los gráficos a) y b) de la figura 39, son resultantes de la interacción de las dos variables (días contra tratamiento), donde se puede apreciar con mayor precisión en que tratamiento y en qué día se encontró el mayor contenido de carbohidratos.

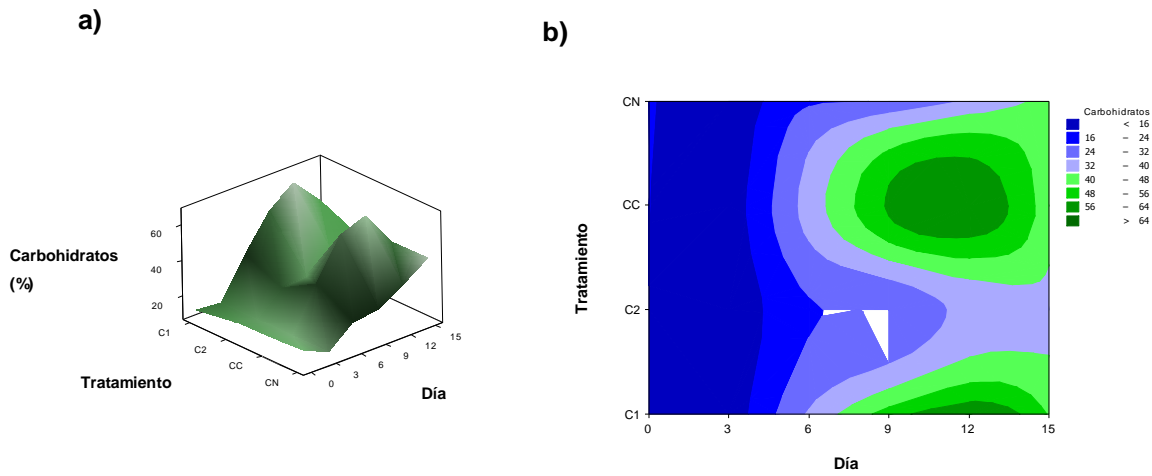


Figura 39. a) Superficie tridimensional de día contra tratamiento y concentración de carbohidratos (%) para los tratamientos C1, C2, CC y CN. b) Grafico de contorno de la superficie día contra tratamiento y concentración de biomasa (Minitab 15).

Los resultados muestran que el contenido de carbohidratos fue superior en los tratamientos C1 y CC mostrando valores similares y sin diferencias significativas a lo largo del desarrollo del cultivo, logrando valores máximos promedio de 62.02 y 62.09 %, respectivamente, registrados al doceavo día. El contenido total de carbohidratos durante todo el desarrollo del cultivo para los tratamientos C1, C2, CC y CN fue de 36.26, 24.56, 37.34 y 25.35 %, respectivamente (Tabla 18).

Por lo tanto, los máximos valores de carbohidratos se registraron durante la fase estacionaria (día 12) con un valor promedio de 47.82 %, mientras que los valores más bajos se presentaron durante la fase exponencial (día 3) con 10.92 % (Tabla 18).

La concentración de nitrógeno y fósforo en los tratamientos C1 y C2, afecto de manera significativa el contenido de carbohidratos. Los resultados de la prueba de t (student) muestran que el contenido de carbohidratos fue superior en el tratamientos que contenían bajas concentraciones de nitrógeno y fósforo (C1) durante todas las fases de crecimiento, durante la fase exponencial (día 3), donde los tratamientos C1 y C2 registraron valores estadísticamente iguales ($p > 0.05$), (Fig. 40).

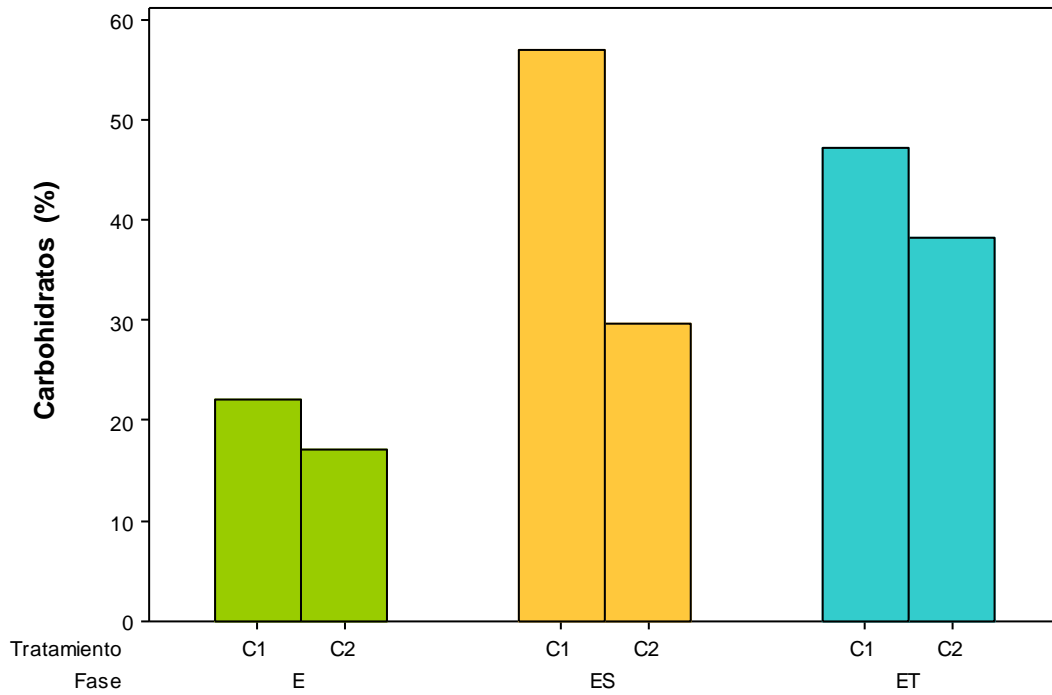


Figura 40. Contenido promedio de carbohidratos (%) de las células de *Chlorella sorokiniana* cultivada bajo 2 condiciones de cultivo (nitrógeno:fósforo) : C1 (bajo:bajo), C2 (alto:alto), durante las distintas fases de crecimiento: E:fase exponencial; ES: fase estacionaria; ET: fase estacionaria tardía.

Tabla 18. Contenido de carbohidratos promedio (%) durante todo el periodo experimental de *Scenedesmus dimorphus* cultivada bajo 6 condiciones de cultivo (nitrógeno:fósforo): C1 (bajo:bajo), C2 (alto:alto), CC (0:0), CN (nutrición normal). Letras iguales pertenecen al mismo grupo, por otro lado, medias con letras diferentes muestran una diferencia significativa entre sí (promedio de todo el periodo experimental).

Día	Tratamiento				Promedio por día
	C1	C2	CC	CN	
0	12.48 ± 1.96	15.87 ± 0.65	16.18 ± 1.09	17.26 ± 2.74	15.45 ^a
3	11.04 ± 1.31	10.66 ± 0.16	10.83 ± 1.09	11.16 ± 1.53	10.92 ^a
6	33.02 ± 2.71	23.46 ± 1.22	35.19 ± 1.55	22.81 ± 3.30	28.62 ^{bc}
9	51.85 ± 3.90	25.07 ± 5.30	56.98 ± 2.29	25.13 ± 0.78	39.76 ^c
12	62.02 ± 5.54	34.13 ± 2.38	62.09 ± 4.36	33.04 ± 4.09	47.82 ^c
15	47.18 ± 0.16	38.20 ± 2.17	42.77 ± 3.16	42.72 ± 4.90	42.72 ^c
Promedio por tratamiento	36.26 ^a	24.56 ^b	37.34 ^a	25.35 ^b	30.72

8. DISCUSSION

Las microalgas como materia para la producción de biodiesel se ha vuelto más atractivo debido a sus diversas ventajas como las elevadas tasas de crecimiento y alto contenido en lípidos. Los resultados obtenidos en este trabajo, demostraron que cuando las Chlorophyceae *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus dimorphus* fueron cultivadas a diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo, provocaron una variación en su densidad celular, concentración de biomasa y su composición química (lípidos, proteínas y carbohidratos).

En el contexto de este trabajo, se hace una diferencia entre la deficiencia de nutrientes y limitación de nutrientes. La deficiencia de nutrientes se logra cuando el suministro exógeno se agota y la célula se ve obligada a utilizar sus reservas endógenas, mientras que la limitación de nutrientes el cultivo generalmente crece y se adapta a un ambiente constante pero insuficiente del nutriente limitante (Rodolfi *et al.*, 2009).

8.1. Densidad celular y biomasa de *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus dimorphus*

El impacto de las diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo en el crecimiento celular de *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus dimorphus*, fue examinado por medio de dos indicadores: la densidad celular (cel ml^{-1}) y la concentración de biomasa (g l^{-1}).

La densidad celular de *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella sorokiniana* puede variar en respuesta de la concentración de nitrógeno y fósforo. Al comparar todos los tratamientos en los cuales *Scenedesmus dimorphus* fue cultivada (S1, S2, S3, S4, SC y SN) los resultados del análisis de varianza indicaron, que durante todas las fases de crecimiento, la concentración de nitrógeno y fósforo influyeron en el crecimiento celular, excepto durante la fase exponencial, donde solo el nitrógeno influyó en el crecimiento de las células, con una interacción significativa entre estas dos variables durante la fase estacionaria. El análisis de efectos principales y dicha interacción demuestran que durante todas las fases de crecimiento los tratamientos donde *Scenedesmus dimorphus* fue cultivada bajo altas concentraciones de nitrógeno registraron una mayor densidad celular que aquellos que contenían concentraciones bajas de nitrógeno,

independientemente de la concentración de fósforo (baja o alta). En lo que respecta a la densidad celular registrada en los diferentes tratamientos donde fue cultivada *Chlorella sorokiniana* mostró el mismo comportamiento, exhibiendo en todo momento una mayor densidad celular en aquellos tratamientos que contenían altas concentraciones de nitrógeno. Los resultados del presente trabajo fueron consistentes con otros estudios. Dean *et al.* (2010) cultivaron a *Chlamydomonas reinhardtii* y *Scenedesmus subspicatus* bajo tres condiciones diferentes de nitrógeno (NaNO_3): alto (19.6 mg l^{-1}), medio (3.0 mg l^{-1}) y bajo (0.8 mg l^{-1}), sus resultados muestran que las células de *C. reinhardtii* que fueron cultivadas bajo altas concentraciones de nitrógeno exhibieron una mayor concentración celular ($4.1 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$) respecto a los cultivos con nitrógeno intermedio ($1.4 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$) y bajo ($0.7 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$), mientras las células de *S. subspicatus* en el tratamiento de nitrógeno alto también fue sustancialmente mayor que en los otros dos tratamientos, registrando una concentración máxima de $18.8 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$ en el tratamiento que contenía altas concentraciones de nitrógeno, mientras que con la concentración intermedia y baja alcanzó una concentración de tal solo 3.0 y $1.0 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$, respectivamente.

Sin embargo, no siempre la cantidad de nitrógeno en el medio es proporcional a una elevada concentración celular, lo anterior fue observado por Li *et al.* (2008) que cultivaron a *Neochloris oleabundans* bajo 5 condiciones diferentes de NaNO_3 (3, 5, 10, 15 y 20 Mm) y observaron que el crecimiento celular disminuyó cuando la concentración de NaNO_3 aumento de 10 Mm a 15 y 20 Mm, por lo que sugirieron que el nitrato de sodio a altas concentraciones puede inhibir el crecimiento de *Neochloris oleabundans*.

Por su parte, Liu *et al.*, (2007) mencionan que las cepas de *Chlorella* presentan una elevada eficiencia fotosintética por ello registran un crecimiento más rápido que el resto de las cepas que se han estudiado, este trabajo no fue la excepción, ya que el número de células de *Chlorella sorokiniana* registradas en cada uno de los tratamientos de estudio, fue superior a los registrados en los tratamientos de *Scenedesmus dimorphus*. No obstante, cuando ambas microalgas fueron cultivadas en el medio de nutrición

normal SN y CN, registraron valores muy superiores al resto de los tratamientos (55.94 y 39.80×10^6 cel ml^{-1} , respectivamente), esto quizá se deba a que los medios que contenían altas concentraciones de nitrógeno (S3, S4 y C2) contenían solamente un 50% de la cantidad de nitrógeno que contenía el medio de nutrición normal, mientras que los tratamientos que contenían bajas concentraciones de nitrógeno (S1, S2 y C1) solamente presentaban un 4 % de la cantidad de nitrógeno que contenía el medio de nutrición normal (Tabla 1), otra razón puede ser que el medio de nutrición normal tenía nitrato de sodio (NaNO_3) como fuente de nitrógeno, mientras que los tratamientos de estudio contenían cloruro de amonio (NH_4Cl) y las células tuvieron preferencia a los nitratos (NO_3^-) en vez de amonio (NH_4^+) como fuente de nitrógeno para su crecimiento, lo anterior fue observado por Che *et al.* (2011) que cultivo *Dunaliella tertiolecta* en NaNO_3 y NH_4Cl , reportaron que *Dunaliella* se adaptó mejor a NO_3^- que a NH_4^+ al obtener una producción de biomasa máxima con dicha fuente de nitrógeno, es importante mencionar que la utilización de distintas fuentes de nitrógeno varía según la especie y se ve reflejado en la concentración celular. Por otro lado Xin *et al* (2010) cultivaron la microalga *Scenedesmus sp.* LX1 bajo diferentes fuentes de nitrógeno tales como NaNO_3 (91.1 mg l^{-1}), NH_4Cl (57.3 .1 mg l^{-1}) y urea (32.1 mg l^{-1}), los resultados muestran que durante los primeros 5 días las células crecieron rápidamente con NH_4Cl , sin embargo, durante la fase estacionaria la densidad celular fue significativamente menor que con nitrato y urea, ellos adjudican dicha disminución al efecto inhibitor del pH ácido del cultivo de algas debido a la liberación de H^+ durante el proceso de cultivo de algas.

La generación de biomasa (g l^{-1}) de *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus dimorphus* mostró el mismo comportamiento que la densidad celular, ya que también este parámetro varió en respuesta de la interacción entre la concentración de nitrógeno y fósforo durante las diferentes fases de crecimiento, los resultados de dichas interacciones muestran que se observó una mayor cantidad de biomasa en aquellos tratamientos que contenían condiciones ricas de nitrógeno, dicho en otras palabras, a pesar de que el fósforo es un nutriente esencial para el crecimiento afectó en menor medida en la concentración de biomasa en ambas microalgas, por lo tanto y como era

de esperarse los tratamientos que contenían las concentraciones más bajas de nitrógeno registraron una concentración de biomasa más baja. Siendo así, la concentración de nitrógeno se correlacionó positivamente con la producción de biomasa. Dichos resultados fueron consistente a los de Lv *et al.* (2010) que cultivaron *Chlorella vulgaris* bajo diferentes concentración de nitrógeno (0.2, 1.0, 3.0, y 5.0 mM KNO₃) sus resultados demuestran que a medida que la concentración de nitrógeno incrementaba de 0.2 a 5.0 mM, la concentración de biomasa aumentó de 0.4 a 1.20 g l⁻¹.

En este estudio, la concentración de biomasa promedio para *Scenedesmus dimorphus* durante todo el periodo experimental en los tratamientos S3, S4 y SN (nitrógeno alto) fue de 0.44, 0.60 y 1.06 g l⁻¹, respectivamente, mientras que los valores promedio para *Chlorella sorokiniana* en los tratamientos con altas concentraciones de nitrógeno (C2 y CN) fueron de 1.06 y 1.42 g l⁻¹, respectivamente. Por lo tanto, los resultados muestran que *Chlorella sorokiniana* genera mayor concentración de biomasa y por lo tanto una mayor productividad de biomasa que *Scenedesmus dimorphus*. La concentración de biomasa también varió en función de la fase de crecimiento, para ambas especies los máximos valores de biomasa se registraron durante la fase estacionaria.

Los resultados del presente trabajo implican que las diferencias encontradas en la densidad celular y concentración de biomasa en los cultivos de *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus dimorphus*, se puede explicar como un reflejo del aporte de la concentración de nitrógeno, ya que el nitrógeno después del carbono es el nutriente más importante que contribuye a la producción de biomasa y crecimiento celular, no menos importante es el fósforo que también es esencial para el crecimiento e involucra numerosos procesos metabólicos tales como: la energía de transferencia (ATP), biosíntesis de ácidos nucleídos y DNA, etc. Es por ello que el descenso de la densidad celular y consecuentemente la concentración de biomasa se debe principalmente a la disponibilidad de nitrógeno en el medio (Chen *et al.*, 2011; Richmond, 2004).

En cuanto a los cambios de color observados en las células de *Scenedesmus dimorphus*, de verde a verde claro y luego a marrón, los resultados de Mutlu *et al.*

(2011) y Guevara *et al.* (2005) indicaron que el cambio de tonalidad en los cultivos se debe a un aumento en los carotenoides y se hace evidente en las células estresadas por deficiencias de nutrientes, además que este pigmento pueden alcanzar mayores concentraciones si se limita la disponibilidad principalmente del nitrógeno en el medio de cultivo. La producción de carotenoides en las cepas de *Scenedesmus dimorphus* probablemente fue generada evolutivamente por las condiciones estresantes que le estaba proveyendo la limitación de nitrógeno como un mecanismo de fotoprotección de la célula.

Esta razón, convierte a *Scenedesmus dimorphus* como una fuente potencial de caroteno natural de importancia a nivel comercial en las industrias alimenticias y farmacéuticas, así como una herramienta útil para estudios bioquímicos relacionados con la biosíntesis de pigmentos. Este fenómeno no fue observado en *Chlorella sorokiniana*, sin embargo se observó un blanqueamiento en cultivo control (CC) hace suponer una disminución de clorofila *a*, debido a la limitación de nutrientes como mecanismo de fotoprotección. Mutlu *et al.* (2011), reportaron que existe una relación directa entre el contenido de nitrógeno y la concentración de clorofila *a*, registrando que el contenido de clorofila *a* disminuye conforme disminuye el contenido de nitrógeno en el medio.

8.2. Composición química de *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus dimorphus*

En condiciones de crecimiento favorables, las algas sintetizan los ácidos grasos principalmente para la esterificación de lípidos polares (por ejemplo glicolípidos y fosfolípidos), los principales componentes de las membranas intracelulares. Bajo condiciones ambientales desfavorables o de estrés, sin embargo, muchas algas alteran sus vías de biosíntesis de lípidos para la formación y acumulación de lípidos neutros, principalmente en forma de triglicéridos (TAG), los lípidos neutros pueden ser

fácilmente convertidos a biodiesel u otros tipos de combustibles a través de procesos de refinación de petróleo existentes y emergentes (Li *et al.*, 2011).

Normalmente, las microalgas contienen tres tipos de sustancias orgánicas o componentes bioquímicos: proteínas, lípidos y carbohidratos. Al manipular las concentraciones de nitrógeno y/o fósforo en los medios de cultivo y al ser estos últimos unos de los macronutrientes más importantes para su desarrollo, su manipulación puede provocar cambios importantes en el crecimiento así como en su composición química (Li *et al.*, 2010; Fidalgo *et al.*, 1994). De acuerdo con informes de la literatura se sabe que la composición bioquímica de algunas microalgas varía en función de la fase de crecimiento. Con el fin de optimizar la composición bioquímica de *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus dimorphus*, se examinó con especial énfasis los cambios observados durante sus distintas fases de crecimiento.

La acumulación de lípidos en las algas se produce normalmente durante los periodos de estrés, en condiciones deficientes de nutrientes (Chen *et al.*, 2011). Los resultados de este estudio muestran que el contenido de lípidos de *Scenedesmus dimorphus* en los tratamientos S1, S2, S3 S4 varió en respuesta de la concentración de nitrógeno y fósforo que se les suministró a los cultivos, pero principalmente por la concentración de nitrógeno, sin registrar alguna interacción entre estas dos variables durante el desarrollo del cultivo (Tabla 5), Chen *et al.* (2011) mencionan que el nitrógeno tiene un efecto importante en la producción de lípidos. Al parecer la limitación y/o deficiencia de fósforo no pareció ser un estimulante adecuado para la acumulación de lípidos en las células de *Scenedesmus dimorphus*, quizá esto se deba a que las reservas endógenas de fósforo fueron suficientes para su crecimiento, estos resultados fueron consistentes a los de Chen *et al.* (2011), en el cual la limitación de fósforo en *Dunaliella tertiolecta* no estimulo la inducción lipídica debido a las reservas intracelulares de dicho compuesto.

En este estudio a menores concentraciones iniciales de nitrógeno, *Scenedesmus dimorphus* acumuló un alto contenido de lípidos por biomasa seca, es por ello que el contenido lipídico fue superior en aquellos tratamientos que contenían una atmosfera limitante de nitrógeno (S1, S2, SC) que cuando se cultivaron en condiciones suficientes

de nitrógeno (S3, S4, SN). Siendo así, como era de esperarse los tratamientos S1 y S2 al estar limitados de nitrógeno, las células acumularon una concentración de lípidos superior que el resto de los tratamientos registrando valores promedio máximo de 42.11 y 38.74 %, respectivamente, sin embargo el tratamiento control (SC) al estar limitado de los principales macronutrientes estimuló una mayor acumulación de lípidos respecto a los demás tratamientos con un valor promedio máximo de 44.03 %, estos valores no registraron diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$)

En cambio cuando las células fueron cultivadas bajo condiciones suficientes de nitrógeno (S3, S4 y SN) a medida que el cultivo avanzaba y al presentar mas nitrógeno biodisponible para su crecimiento presentó una mayor densidad celular y por lo tanto un mayor consumo de nutrientes, por lo que esto hace suponer que la concentración de nitrógeno disminuyó al grado de poner en condicione deficientes a las células de *Scenedemus dimorphus* registrando un aumento en el contenido lipidico al final del periodo experimental para estos tratamientos (Figura 14). Antes de que las células se encontraran en una situación deficiente de nitrógeno el contenido lipidico para los tratamientos S3, S4 y SN fue de 25.37 %, 19.57% y 20.30%, respectivamente, siendo estadísticamente diferente el contenido lipidico del tratamiento S3 respecto a los otros dos ($p < 0.05$). Esto hace suponer que las células de *Scenedesmus dimorphus* responden a la limitación y deficiencia de nitrógeno como estrategia para la inducción y acumulación de lípidos.

Estos resultados fueron consistentes a los de Yeesang y Cheirsilp (2011) que aislaron cuatro microalgas verdes (TRG, KB, SK y PSU) e identificadas por criterios morfológicos como *Botryococcus spp.* y fueron cultivadas bajo condiciones limitantes y suficientes de nitrógeno. En el medio suficiente de nitrógeno, las cepas lograron un contenido en lípidos de 25.8%, 17.8%, 15.8% y 5.7%, respectivamente, sin embargo la acumulación de lípidos mejoró en condiciones limitante de nitrógeno hasta 35.9 %, 30.2 %, 28.4 % y 14.7%, respectivamente. Lo que hace suponer que una reducción de la concentración de nitrógeno aumentó de manera significativa la fracción de lípidos. También reportaron que las células en condiciones limitantes y/o deficientes de

nitrógeno a menudo acumulan un exceso de metabolitos de carbono en forma de lípidos. Por su parte, Lv *et al.* (2010) estudiaron el efecto de la concentración de KNO_3 (0.2, 1.0, 3.0 y 5.0 mM) en los niveles de lípidos de *Chlorella vulgaris*, demostraron que el contenido de lípidos decrece con el incremento de la concentración de KNO_3 .

A pesar de que se ha reportado que la deficiencia de nitrógeno conduce a la acumulación de lípidos en una serie de microalgas, *Chlorella sorokiniana* no corrió con la misma suerte, ya que en esta cepa la deficiencia de nitrógeno y/o fósforo no pareció ser un estimulante adecuado para la acumulación de lípidos. Los resultados muestran que no existieron diferencias significativas entre el contenido de lípidos registrados en cada uno de los tratamientos. Dicho en otras palabras, el contenido de lípidos de *Chlorella sorokiniana* fue el mismo en condiciones limitante que en condiciones suficientes de nutrientes, registrando un valor de aproximadamente 18 % de lípidos (promedio durante todo el periodo experimental) y al parecer no hubo inducción lipídica, Huntley y Redalje (2006) y Rodolfi *et al.* (2009) reportaron que *Chlorella sorokiniana* logró acumular un 20% y 19.3 % de lípidos, respectivamente en condiciones suficientes de nitrógeno, resultados que concuerdan con los obtenidos en este estudio.

Sin embargo, los resultados indican claramente que el contenido de lípidos de *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus dimorphus* está relacionado con la fase de crecimiento (Fig. 13). En este estudio cuando los tratamientos de *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus dimorphus* se encontraban en fase de crecimiento exponencial, se exhibió una ligera disminución en el contenido lipídico de ambas microalgas en cada uno de sus tratamientos, registrando un valor promedio de aproximadamente 13.15 % y 14.06 %, respectivamente. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Valenzuela-Espinoza *et al.* (2005) que al analizar la composición química de *Rhodomonas sp.* se registró una disminución de los productos de reserva (lípidos y carbohidratos) durante la fase exponencial, ellos adjudican este descenso a las elevadas tasas de crecimiento que caracterizan la fase exponencial, desviando el flujo metabólico a la producción de proteínas. Algo similar también fue observado por Lv *et al.* (2010) y Valenzuela-Espinoza *et al.* (2002) que registraron una ligera disminución en

el contenido de lípidos de *Chlorella vulgaris* e *Isochrysis galbana* durante los primeros días de la inoculación, mientras que un incremento en el contenido lipídico en las siguientes etapas lo correlacionaron con el estrés ambiental propiciado por la limitación de nutrientes.

Sin embargo, no fue sino hasta la fase estacionaria cuando el contenido de lípidos aumentó en todos los tratamientos en donde fue cultivada *Scenedesmus dimorphus*, sin embargo se registró un aumento más significativo en los tratamientos S1, S2 y SC, esto quizá se deba a que el contenido de nitrógeno en estos tratamientos era limitante, mientras que en el resto de los tratamientos se hace suponer que las condiciones de nitrógeno aun no eran deficientes. Lo que sugiere que la acumulación de lípidos en la fase estacionaria se debe a la disminución de nitrógeno en el medio de cultivo y por lo tanto a la generación de moléculas de reserva como los lípidos para participar en el almacenamiento energético de la célula. En lo que respecta a *Chlorella sorokiniana* se registró un ligero aumento en el contenido lipídico durante la fase estacionaria registrando valores promedio 21.60, 22.46, 25.05, 21.33 % para los tratamientos C1, C2, CC y CN, respectivamente.

Mientras que durante la fase estacionaria tardía, el contenido de lípidos en los tratamientos S1, S2 y S3, disminuyó, esto pudo ser debido a que las microalgas utilizaron sus reservas energéticas como método de supervivencia debido al avanzado estado del cultivo, mientras que el contenido de lípidos en los tratamientos S3, S4 y SN exhibieron sus máximos valores (31.86, 33.48 y 28.04 %, respectivamente), mientras que los valores para *Chlorella sorokiniana* no registró un aumento significativo en el contenido de lípidos desde el inicio de la fase estacionaria hasta el final de la fase tardía ($p > 0.05$). Por lo que *Chlorella sorokiniana* no cumple la hipótesis de inducción de lípidos en condiciones deficientes y/o limitantes de nutrientes. De acuerdo con informes de literatura las especies de microalgas del género *Chlorella* suelen acumular carbohidratos como producto principal de almacenamiento de carbono en vez de lípidos (Dorval *et al.*, 2010). Sin embargo, Illman *et al.* (2000), observaron que *Chlorella emersonii*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella vulgaris* y *Chlorella pyrenoidosa* podrían

acumular lípidos hasta un 63%, 57%, 40% y 23%, en sus células en base a peso seco, respectivamente, bajo condiciones limitantes de nitrógeno a mediano plazo. Por otro lado Liu *et al.* (2007) menciona que las cepas de *Chlorella* tienen un gran potencial para ser un recurso para la producción de biodiesel debido a su rápido crecimiento y fácil cultivo. Sin embargo el contenido de lípidos en condiciones de crecimiento general de la mayoría de las cepas de *Chlorella* es de 14-30 % en peso de biomasa seca.

Para que la producción de biodiesel a partir de microalgas sea factible es necesario tener una elevada productividad de lípidos, sin embargo, al ser la producción del lípidos un producto de la producción de biomasa y el contenido de lípidos, dichos parámetros afectan la viabilidad económica del aceite de microalgas para la producción de biodiesel. Lamentablemente, la mayoría de las especies de microalgas producen grandes cantidades de lípidos solo bajo condiciones de estrés, por ejemplo la deficiencia de nitrógeno, sin embargo casi siempre es compensado con bajas tasa de crecimiento y por lo tanto bajas productividades de biomasa, sin efectos beneficiosos en términos productividad de lípidos. Chen *et al.* (2011) mencionan que en situaciones de estrés ambiental (tales como la limitación de nutrientes), la división celular puede cesar, pero la productividad de lípidos “aparenta” mantenerse elevada, llevando a una acumulación de lípidos en la célula. Sin embargo, el contenido alto de lípidos no lleva a una productividad elevada de lípidos, ya que los rangos de la productividad de lípidos son menores durante los periodos de limitación de nutrientes.

Los resultados de este estudio fueron consistentes a lo antes mencionado, ya que a pesar de que *Scenedesmus dimorphus* respondió favorablemente a la inducción lipídica causada por la limitación de nitrógeno alcanzando valores promedio máximo de 42.11, 38.74 y 44.03 % para los tratamientos S1, S2 y SC, no logró una elevada productividad de biomasa, debido precisamente a la carencia de nutrientes, afectando negativamente la producción de lípidos, por estas razones registraron los valores más bajos de productividad presentando solamente 0.003, 0.005 y 0.003 g l⁻¹d⁻¹ para los tratamientos S1, S2 y SN, respectivamente. Caso contrario sucedió con las productividades de lípidos de aquellos tratamientos que contenían altas concentraciones de nitrógeno (S3,

S4 y SN) ya que fueron compensados por elevadas tasa de producción de biomasa y por lo tanto una productividad de lípidos más elevada que la registrada en los tratamientos que exhibieron un elevado contenido lipídico (S1, S2 y SC), por ello el tratamiento S4 registró una productividad de lípidos de $0.029 \text{ g l}^{-1}\text{d}^{-1}$ siendo superior a todos los tratamientos a los que se les modificó las concentraciones iniciales de nitrógeno y fósforo, sin embargo el tratamiento SN al contener una productividad de biomasa más elevada que el resto de los tratamientos también presentó los valores más altos en cuanto a productividad de lípidos se refiere registrando un valor promedio de $0.048 \text{ g l}^{-1}\text{d}^{-1}$. A pesar de que *Chlorella sorokiniana* no respondió de manera significativa a la inducción de lípidos, las tasas de crecimiento fueron superior a las registrada por *Scenedesmus dimorphus* (Tabla 8 y 16), por lo tanto generó una mayor concentración de biomasa y el contenido de lípidos logrado por esta cepa fue suficiente para registrar una productividad de lípidos superior a todos los tratamientos de *Scenedesmus dimorphus*. Siendo así, el tratamiento CN registró los niveles más altos en cuanto a productividad de lípidos se refiere presentando un valor promedio de $0.054 \text{ g l}^{-1}\text{d}^{-1}$, no menos importante fue el valor de $0.033 \text{ g l}^{-1}\text{d}^{-1}$ registrado para el tratamientos C2.

Los resultados de este estudio muestran que los valores de productividad de lípidos tanto de *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus dimorphus* se alcanzaron al final de la fase exponencial (cuando hay más biomasa). En la mayoría de los casos la productividad de los lípidos fue inversamente proporcional al contenido de lípidos acumulado por la célula y proporcional a la productividad de biomasa.

Productividades similares a los de este estudio obtuvieron Lv *et al.* (2010) que al cultivar a *Chlorella vulgaris* bajo condiciones limitantes registró un contenido lipídico de casi 60%, pero con un contenido de 0.7 g l^{-1} biomasa inferior al registrado en este estudio (1.42 g l^{-1} y 18 % de lípidos) alcanzando una productividad de lípidos de $0.032 \text{ g l}^{-1}\text{d}^{-1}$, como se puede observar, este es un claro ejemplo de la importancia del contenido de biomasa y lípidos, para obtener una elevada productividad de lípidos. Estos resultados hacen suponer que *Chlorella sorokiniana* es una especie ideal para la

producción de biodiesel a partir de microalgas debido a su alta productividad de biomasa que se correlaciona de manera positiva a las elevadas productividades de lípidos.

Investigaciones posteriores como la de Lv *et al.* (2010) sugieren que las cepas de microalga del genero *Chlorella* son las principales candidatas para la producción de biodiesel, precisamente por sus rápido crecimiento y su fácil cultivo. Por su parte, Cuaresma *et al.* (2009) eligieron a *Chlorella sorokiniana* debido a su alta tasa de crecimiento y su tolerancia a alta irradiación y altas concentraciones de CO₂. Previos estudios han demostrado que *Chlorella sp.* fue una de las 3 especies que al ser cultivada en estanques abiertos era difícil de ser contaminada por otros taxones. (Huntley y Redalje, 2006). Por su parte, Illman *et al.* (2000) reportaron que el contenido de lípidos de *Chlorella vulgaris* en condiciones autótrofas solo alcanzó un 14 % de lípidos en base a peso seco, sin embargo sugieren que puede aumentar hasta un 40 % en condiciones limitantes de nutrientes y alcanzar una productividad de lípidos de 0.014 g l⁻¹d⁻¹.

Rodolfi *et al.* (2009) encontraron que la privación de nitrógeno podría estimular la acumulación de lípidos pero con una disminución en la productividad de biomasa, reportando que por lo general niveles nitrógeno por debajo de 5 mM no podría satisfacer las necesidades de la microalga. Mientras que Li *et al.* (2008) señalaron que la máxima producción de lípidos se obtuvo a 5 mM, pero no a 3 mM, donde se logró el mayor contenido de lípidos y reportaron que el aumento en el contenido de lípidos en una atmosfera limitante de nitrógeno se debe a la inhibición de la división celular como resultado de las presiones ambientales. Mientras que los resultados experimentales de Hsieh y Wu (2009) muestran que un aumento en la concentración de urea en el medio de cultivo condujo a una disminución en el contenido de lípidos de *Chlorella vulgaris*, logrando un 66.1 % de lípidos con una concentración de urea inicial de 0.025 g l⁻¹, sin embargo la productividad de lípidos disminuyó a medida que la concentración de urea aumento de 0.100 a 0.200 g l⁻¹, como consecuencia la concentración de urea inicial 0.100 g l⁻¹ registró la máxima productividad de lípidos (0.124 g l⁻¹d⁻¹).

Una de las medidas es la de cultivar grandes cantidades de biomasa de algas y luego inducir la acumulación de lípidos en condiciones limitantes de nutrientes. Rodolfi *et al.* (2009) fueron los primeros en informar un aumento en el contenido de lípidos y de productividad en dos fases de cultivo, los investigadores lo llaman sistema híbrido, ya que combinan dos fases esenciales para la un aumento en el contenido de lípidos y de la productividad de biomasa (1) una fase de nutrientes suficientes capaz de generar grandes cantidades de biomasa en condiciones suficientes de nutrientes seguida de por (2) una fase de limitación de nitrógeno para estimular la síntesis de lípidos. Sus resultados muestran que durante la primera fase alcanzó una productividad de biomasa relativamente alta (alrededor de $0.30 \text{ g l}^{-1}\text{d}^{-1}$) y un aumento en el contenido de lípidos durante los primeros tres días de limitación (de 30% a 60%) logrando una productividad media de lípidos de $0.204 \text{ g l}^{-1}\text{d}^{-1}$.

Por su parte, el contenido de proteínas de ambas especies se vio afectado principalmente por la concentración de nitrógeno durante todas las fases de crecimiento. En lo que respecta a *Scenedesmus dimorphus* los resultados del análisis de varianza muestran que el contenido de proteínas se vio afectado principalmente por la concentración de nitrógeno, el análisis de efectos principales muestra que se observó un mayor contenido de proteínas en aquellos tratamientos que contenían una concentración alta de nitrógeno inicial (S3 y S4).

El nitrógeno es sin duda el componente principal para la síntesis de proteínas y una deficiencia de este elemento disminuye drásticamente dicha síntesis (Deng *et al.*, 2011), es importante mencionar, que las microalgas incorporan el nitrógeno no proteico (NH_4 , NO_3 , NO_2 , y urea) para ser convertido posteriormente a proteínas, es por ello, que los tratamientos que contenía las concentraciones más altas de nitrógeno (S3, S4 y SN) registraron los valores más altos de proteínas durante todo el desarrollo experimental, caso contrario se registró en los tratamientos que contenían los niveles más bajo de nitrógeno (S1, S2, SC), el mismo comportamiento se observó en el caso de *Chlorella sorokiniana*, sin embargo, es bien sabido que la mayoría de las especies del genero *Chlorella* contienen altos valores de proteínas (50-60 %) comparados al

resto de las especies (Mutlu *et al.*, 2011). En este estudio no fue la excepción ya que *Chlorella sorokiniana* registró un contenido de proteína superior a *Scenedesmus dimorphus*, alcanzando un valor promedio de aproximadamente 64.97 % en cada uno de los tratamientos durante la fase exponencial, mientras que *Scenedesmus dimorphus* registró un valor promedio de aproximadamente 44.45 % en cada uno de los tratamientos en la misma fase. Esta desigualdad podría estar relacionada con diferencias específicas en el metabolismo celular, generando una variación en el equilibrio químico de proteínas de ambas especies (Matos *et al.*, 2007). Lo que posiciona a *Chlorella sorokiniana* como una fuente prometedora de proteína natural, que puede ser utilizado para alimento para ganado o biofertilizantes.

Estos resultados fueron consistentes a los de Mutlu *et al.* (2011) que cultivaron a *Chlorella vulgaris* bajo diferentes concentraciones de nitrógeno, el contenido de proteínas que registró el tratamiento en condiciones suficientes de nitrógeno, presentó el nivel más alto de proteínas (50.8 %), mientras que al cultivar las células sin ninguna fuente de nitrógeno presentó un 13.01 %, no obstante, cuando la concentración de nitrógeno se redujo a la mitad, la concentración de proteínas presentó un valor de 20.3%, dichos resultados muestran que la concentración de proteínas está en función de la concentración de nitrógeno inicial en las que son cultivadas las células.

El contenido de proteínas varió de acuerdo a las condiciones del cultivo y a la fase de crecimiento, comportándose de manera descendente en ambas microalgas, los valores más altos en el contenido de proteínas se presentaron durante la fase de crecimiento exponencial, para cada uno de los tratamientos en ambas microalgas, registrando un promedio de 44.45 % para *Scenedesmus dimorphus* y 59.23 % para *Chlorella sorokiniana*, para cada uno de los tratamientos (promedio general durante la fase exponencial). Una tendencia similar fue observada por Matos *et al.* (2007) que registraron los niveles más altos de proteína en *T. suecica* (0.306 g l⁻¹) durante la fase de crecimiento exponencial, Valenzuela-Espinoza *et al.* (2002) reportaron que los niveles más altos de proteína de *Isochrysis aff. galbana* cultivada en el medio f/2 y un

medio a base de fertilizantes se presentaron durante la fase exponencial (45.31 % y 41%, respectivamente).

La razón de que los niveles más altos de proteína se registren durante la fase de crecimiento exponencial, se debe a que en esta fase existe una mayor concentración de nitrógeno que aun no es consumido por las células, como ya se sabe el nitrógeno es un factor importante para que se lleve a cabo la síntesis de proteínas, a medida de que el cultivo avanza el nitrógeno empieza a ser limitante y/o deficiente por lo que también afecta de manera negativa a la síntesis de proteínas, reduciendo el contenido de proteína, por ello se registran los niveles más bajos de proteínas durante la fase estacionaria, esto también fue observado por Matos *et al.* (2007), en sí, mientras el nitrógeno es deficiente, el contenido de proteínas decrece en general (Mutlu *et al.*, 2011; Converti *et al.*, 2009). Una hipótesis alterna es que el flujo de carbono es dirigido exclusivamente a la síntesis de proteína para apoyar el crecimiento celular tal y como lo mencionan Li *et al.* (2011).

En cuanto al contenido de carbohidratos, mostró un comportamiento similar ascendente a lo largo del desarrollo del cultivo en ambas especies. No obstante, durante la fase de crecimiento exponencial se registró una disminución en el contenido de este constituyente en todos los tratamientos tanto de *Scenedesmus dimorphus* como de *Chlorella sorokiniana*, esto quizá se deba a que a que el flujo de carbón fue direccionado a la síntesis de proteína, Valenzuela-Espinoza *et al.* (2002), reportaron que el contenido de carbohidratos y lípidos de *Isochrysis aff. galbana* decrecieron durante la fase de crecimiento exponencial.

En este estudio *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella sorokiniana* presentaron diferencias significativas en el contenido de carbohidratos en las distintas fases de crecimiento y se vio afectado por la concentración de nitrógeno inicial en el cual fueron cultivadas las células, observándose una mayor contenido de este cosntituyente en las celulas que fueron cultivadas a bajas concentraciones de nitrógeno, mientras que el fósforo no mostró un efecto significativo en el contenido de carbohidratos. Así tenemos que, el contenido celular de carbohidratos se incrementó, alcanzando los valores

máximos durante la fase estacionaria temprana para los tratamientos que contenían los niveles más bajos de nitrógeno (S1, S2, SC, C1 y CC), mientras que para los tratamientos S3, S4, SN, C2 y CN (alto nitrógeno), se presentaron durante la fase estacionaria tardía. Probablemente esto se debió a la disponibilidad de nitrógeno en el medio, ya que el contenido de los compuestos de reserva entre ellos los carbohidratos se empiezan a disparar cuando el nitrógeno empieza a ser limitante y/o deficiente y no existe suficiente nitrógeno disponible para llevar a cabo la síntesis de proteína luego el crecimiento celular cesa y es cuando el flujo de carbono es desviado a la síntesis de carbohidratos (o lípidos), y al contener menos nitrógeno los tratamientos S1, S2, SC, C1 y CC acumularon carbohidratos en una fase más temprana que los tratamientos que contenían altas concentraciones de nitrógeno, estos resultados fueron consistentes a los de Valenzuela- Espinoza *et al.* (2005) que cultivaron *Rhodomonas sp.* y registraron los valores más altos de carbohidratos durante la fase estacionaria. En este estudio, el contenido de carbohidratos fue superior en todo momento en *Chlorella sorokiniana* registrando un valor promedio de 62.02 y 62.09 % en los tratamientos C1 y CC, respectivamente, respecto a 40.14, 38.45 y 38.02 % en los tratamientos S1, S2, y SC de *Scenedesmus dimorphus*, respectivamente. Como se puede observar el contenido más alto de carbohidratos se registró en aquellos tratamientos que contenían las concentraciones más bajas de nitrógeno. De los resultados se puede inferir que *Chlorella sorokiniana* podría ser una fuente prometedora para la producción de bioetanol, ya que respondió a la acumulación de carbohidratos debido a la limitación de nutrientes.

En el presente estudio cuando el contenido de proteínas de *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus dimorphus* decrecía, los carbohidratos y los lípidos incrementaban, esto también fue observado por otros autores (Mutlu *et al.*, 2011; Valenzuela-Espinoza *et al.* 2002). Durante la fase estacionaria, cuando el nitrógeno se vuelve limitante, las células viables continúan fijando carbono desviando el flujo metabólico a la acumulación de productos de reserva como carbohidratos y lípidos, esta es la posible razón de que en este estudio los valores más altos de carbohidratos y lípidos se hayan registrado durante la fase estacionaria (Valenzuela- Espinoza *et al.*, 2005).

Cuando las células se encuentran en condiciones suficientes de nutrientes y la fuente de energía (luz) y la de carbono (CO_2) están disponibles, el flujo de carbono es dirigido a la síntesis de proteínas (niveles altos en fase exponencial), sin embargo cuando el contenido de nitrógeno empieza a ser limitante y/o deficiente, el crecimiento celular empieza a cesar y el flujo de carbono es dirigido a los productos de reserva tales como carbohidratos y lípidos para participar en el mantenimiento de la célula (fase estacionaria), (Li *et al.*, 2010).

A través del proceso de fotosíntesis, las células de microalga asimilan el carbono, y lo hace a partir del ciclo de Calvin que convierte las moléculas inorgánicas de dióxido de carbono a moléculas orgánicas sencillas, este ciclo es la única vía de asimilar el carbono, pero una vez asimilado puede tomar varias forma orgánicas, en la figura 41 se pueden observar las principales formas orgánicas que puede tomar el carbono en las microalgas.

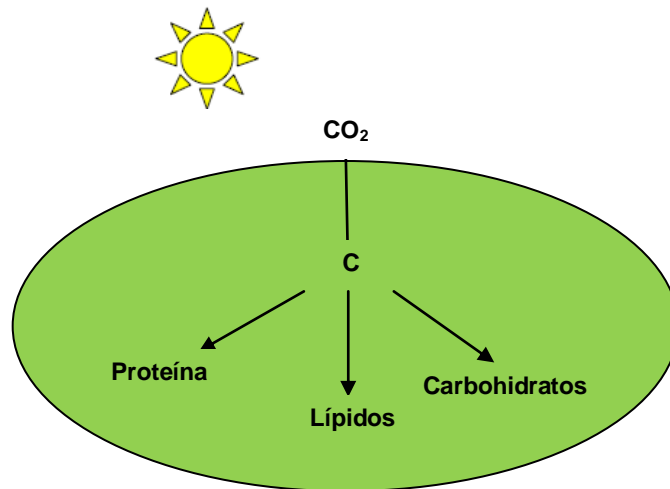


Figura 41. Partición de carbono fotosintético en las microalgas

En la figura 42, se presentan las dos principales formas de almacenamiento de energía que puede tomar el carbono en las microalgas. Algunas microalgas acumulan cantidades similares de carbohidratos y lípidos, mientras que otras solo acumulan carbohidratos (Li *et al.*, 2011). El almidón es el carbohidrato de almacenamiento principal en muchas algas y plantas superiores y su síntesis comparte precursores con la síntesis de lípidos. Muchas algas verdes en particular las clorofitas, usan el almidón como compuesto de almacenamiento primario de carbono (Li *et al.*, 2011), tal fue el caso de *Chlorella sorokiniana* que en este estudio acumuló un mayor contenido de carbohidrato que de lípidos, esto quizá se deba a que esta célula utiliza los carbohidratos como material energético de reserva para su mantenimiento en vez de lípidos. Dorval *et al.* (2009), mencionan que las especies del género *Chlorella* acumulan carbohidratos como material de almacenamiento, al igual que los resultados de Collen *et al.* (2004) que muestran que *Gracilaria tenuispitata* almacenó carbohidratos como constituyente principal de energía en vez de lípidos en condiciones limitantes de nitrógeno, mientras que la adición de nutrientes provocó un aumento en la actividad enzimática y una disminución en el contenido de carbohidratos.

En este estudio, *Scenedesmus dimorphus* registró cantidades similares de carbohidratos y lípidos, por lo que se asume que el flujo metabólico de carbono fue desviado a estos dos componentes de almacenamiento. Estos resultados fueron consistentes a los de Ramazanov y Ramazanov, (2006), en el cual *Chlorella pyrenoidosa* respondió a la limitación de nitrógeno aumentando tanto el contenido de lípidos como el de los carbohidratos como material de reserva.

Diversas investigaciones han sugerido el bloqueo de la vía de síntesis de carbohidratos, desviando todo el flujo de carbono a la producción excesiva de lípidos. Esta hipótesis fue probada por Li *et al.* (2010), que usaron la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* y la bloquearon la síntesis de carbohidratos (inactivación de ADP-glucosa pirofosforilasa) y reportaron un aumento de 10 veces en el contenido de triglicéridos a través del redireccionamiento del carbono fotosintético exclusivamente

a la síntesis de lípidos, ellos sugieren que esta es una estrategia más efectiva que la manipulación directa de la vía de la síntesis de lípidos

Sheen et al. (1998) hacen una analogía sobre lo antes mencionado, en el cual compararan a las enzimas que catalizan las vías metabólicas del carbono con válvulas o grifos y mencionan que “es como cerrar el flujo de carbono que va dirigido a la síntesis de carbohidratos, y mantener abierta la válvula de la síntesis de lípidos con la esperanza de redireccionarlo exclusivamente a la generación de lípidos, sin que se pierda carbono en forma de carbohidratos” (Fig. 42).

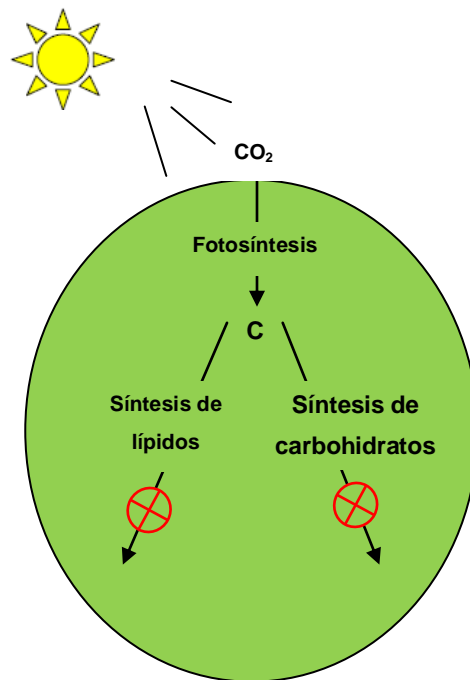


Figura 42. Regulación de las vías del flujo de carbón fotosintético que puede ser útil para aumentar la producción de lípidos bajo condiciones limitantes de nutrientes.

En general, *Scenedesmus dimorphus* pueden acumular un contenido importante de lípido neutros debido a la deficiencia y/o limitación de nutrientes, mientras que la

sientes de lípidos en *Chlorella sorokiniana* no fue estimulada por dicha limitación. Una de las principales desventajas de estimular la síntesis lipídica por limitación de nutrientes es que trae consigo una baja producción de biomasa que es un gran obstáculo para la comercialización de biodiesel a partir de microalgas. En este estudio *Chlorella sorokiniana* presentó una elevada tasa de crecimiento, incluso a bajas concentraciones de nutrientes, registrando incluso una mayor producción de lípidos que *Scenedesmus dimorphus* a pesar de que esta sí se logró inducir la síntesis de lípidos por limitación de nitrógeno. Lo que hace suponer, que existe una relación directa entre la productividad de biomasa y el contenido lipídico de las células, para que sea factible la producción de biodiesel.

9. CONCLUSIONES

En base a los resultados experimentales se pueden deducir las siguientes conclusiones:

- *Scenedemus dimorphus* respondió efectivamente la inducción de lípidos por limitación de nitrógeno y no por la limitación de fósforo. Observando un mayor contenido de lípidos en aquellos tratamientos que contenían bajas concentraciones de nitrógeno inicial. Mientras que en *Chlorella sorokiniana* no se observó la inducción de lípidos por limitación de nitrógeno y fósforo, mostrando una tendencia similar en el contenido de lípidos en condiciones suficientes y limitantes de nutrientes.
- Puesto que la acumulación de lípidos se produce en condiciones limitantes de nitrógeno y debido a las altas tasas de crecimiento que *Chlorella sorokiniana* fue capaz de registrar, presentó una mayor productividad de lípidos en comparación con *Scenedesmus dimorphus*, incluso esta microalga registró elevadas tasas de crecimiento en condiciones limitantes de nutrientes. Por lo tanto esta *Chlorella sorokiniana* es capaz de adaptarse a cambios transitorios de nutrientes y disponibilidad de ellos en el medio. En base a dichas características, se sugiere que podría ser utilizada como una fuente potencial para la producción de biodiesel.
- Al ser el nitrógeno y fósforo componentes esenciales para el crecimiento celular, la densidad celular y la concentración de biomasa generada por *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus dimorphus*, se vieron afectadas por la concentración de nitrógeno y fósforo en el medio, exhibiendo en todo momento un mayor crecimiento y concentración de biomasa en los tratamientos que fueron suplementados con altas concentraciones de nitrógeno
- El contenido de proteínas y carbohidratos se vio afectado por la disponibilidad de nitrógeno en el medio. En general, a mayor concentración de nitrógeno la síntesis de proteínas fue favorecida, principalmente en los tratamientos S3, S4, C2. Mientras que el contenido de lípidos y carbohidratos, a menor concentración

de nitrógeno mayor contenido de lípidos y carbohidratos. Las células *Chlorella sorokiniana* registraron un mayor contenido de proteínas y carbohidratos que *Scenedesmus dimorphus*.

- En general, el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos de ambas microalgas se vio afectado por la fase de crecimiento. En todos los casos, se encontraron los niveles más altos de proteína durante la fase exponencial. Mientras que el contenido de lípidos y carbohidratos en ambas especies se registraron durante la fase estacionaria temprana en aquellos tratamientos que contenían concentraciones bajas de nitrógeno y fase estacionaria tardía en los tratamientos que contenían altas concentraciones de nutrientes.
- De acuerdo a la partición de carbono, se reveló que *Scenedesmus dimorphus* utiliza a los carbohidratos y lípidos como componentes de reserva, en deficiencia y/o limitación de nitrógeno. Mientras que *Chlorella sorokiniana* solamente utiliza a los carbohidratos como almacenamiento de energía.
- Los enfoques empleados en este estudio podrían ser empleados para el diseño de cultivos de microalgas a nivel planta piloto o a gran escala.

10. RECOMENDACIONES

- Si se requiere someter a estrés fisiológico a la célula es necesario que se utilicen métodos que no afecten al crecimiento celular para que se vea reflejado en una elevada productividad de lípidos. Tal es el caso de medios de cultivos suplementados con fierro, es bien sabido que altas concentraciones de fierro inducen a la acumulación de lípidos, y al no ser un macronutriente esencial no afecta el crecimiento celular. Por otra parte, la adición de una fuente de carbono orgánico a los medios de cultivo como la glucosa, sacarosa o glicerol, parece ser factible para aumentar la producción de biomasa y por lo tanto la producción y/o acumulación de lípidos en las células.
- Utilizar un sistema híbrido, donde se cultiven las células en un medio suficiente de nutrientes para generar altas concentraciones de biomasa y posteriormente someterlas a un estrés nutricional bajo limitación de nutrientes para inducir la acumulación de lípidos, de esta manera no se ve mermada la productividad de lípidos.
- Aislamiento y/o recolección de especies autóctonas para iniciar estudios para y comprobar su capacidad en la acumulación de lípidos u otro desarrollo biotecnológico, ya que al ser nativas están aptadas a las condiciones ambientales de la región, pudiendo tener éxito al cultivarlas al aire libre.
- Cultivos de microalgas oleaginosas altamente productivas a gran escala, utilizando aguas residuales como fuente de nutrientes y residuos de emisiones de CO₂ como fuente de carbono. Esto producirá, grandes cantidades de biocombustible, reducción de los nutrientes del agua residual evitando la eutrofización de los cuerpos de agua, reducción de emisiones de CO₂ y generación de co-productos de alto valor agregado. El cultivo de microalgas podría convertirse en una fuente económica y renovable que no pone en peligro los bosques y el suministro de alimentos. Por lo que al llevar a cabo tales proyectos puede permitir el desarrollo sostenible de la industria y la agricultura de la región.

11. LITERATURA CITADA

Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25, 294-306.

Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2009. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Article in press

Huang, G.H., Chen, F., Wei, D., Zhang, X.W., Chen, G., 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy* 87, 38-46.

Singh, S.P., Singh, D., 2010. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 200-216.

Atadashi, I.M., Aroua, M.K., Abdul, A.A., 2010. High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 1999-2008.

Dizgea, N., Keskinler, B., Tarrisevenb, A., 2009. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer. *Biochemical Engineering Journal* 44, 220-225.

Hernández, G.A., Vazquez-Duhalt, A., Sánchez, M.P., 2009. Biodiesel a partir de microalgas. *Biotecnología*, Vol. 13 No. 3.

Byung- Hwan, U., Young-Soo, K., 2009. Review: a chance for Korea to advance algal-biodiesel technology. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 15, 1-7.

Yusuf, N.N.A.N., Kamarudin, S.K., Yaakub, Z., 2011. Overview on the current trends in biodiesel production. *Energy Conversion and Management* 52, 2741-2751.

Dermibas, A., 2009. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management* 50, 14-34.

Demirbas, A., 2010. Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management* 51, 2738-2749

- Miao, X., Wu, Q., 2004. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic. *Journal of Biotechnology* 110, 85-93.
- Demirbas, F.M., 2011. Biofuels from algae for sustainable development. *Applied Energy*. Article in press.
- Sharma, Y.C., Singh B., 2009. Development of biodiesel: Current scenario. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13, 1646-1651.
- Miao, X., Wu, Q., 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology* 97, 841-846.
- Singh, A., Singh, N.P., Murphy, J.D., 2011. Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology* 102, 10-16.
- Liam, B., Philip, O., 2010. Biofuels from microalgae- A review of technologies for production, processing, and extraction of Biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy* 14, 557-577.
- Lozada, I., Islas, J., Grande, G., 2010. Environmental and economic feasibility of palm oil biodiesel in the Mexican transportation sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 486-492.
- Naoko, E., Guan, F., Chen, T., Poon C., 2008. Monitoring biodiesel production (transesterification) using in situ viscometer. *Chemical Engineering Journal* 138, 200-206.
- Helwani, Z., Othaman, M.R., Aziz, N., Fernando W.J.N., Kim, J., 2010. Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review. *Fuel Processing Technology* 90, 1502-1514.
- Jidon, J., Naoko, E., 2010. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 1312-1320.

Fazal, M.A., Haseeb, A.S.M.A, Masjuki, H.H, 2011. Biodiesel feasibility study: An evaluation of material compability; performance; emission and engine durability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15, 1314-1324.

Geller, D.P., Adams, T.T., Goodrum, J.W., Pendergrass, J., 2008. Storage stability of poultry fat diesel fuel mixtures: Specific gravity and viscosity. *Fuel* 87, 92-102.

Haseeb, A.S.M.A., Masjuki, H.H., Ann L.J., Fazal, M.A., 2010. Corrosion characteristics of copper and leaded bronze in palm biodiesel. *Fuel Processing Technology* 91, 329, 334.

Fazal, M.A., Haseeb, A.S.M.A., Masjuki, H.H., 2010. Comparative corrosive characteristics of petroleum diesel and palm biodiesel for automotive materials. *Fuel Processing Technology* 91, 1308-1315.

Umdu, E.S., Tuncer, M., Seker, E., 2010. Transesterification of *Nannochloropsis oculata* microalga's lipid to biodiesel on Al₂O₃ supported CaO and MgO catalysts. *Bioresource Technology* 100, 2828-2831.

Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan S., Kumari, S., Anandraj, A., Bux, F., 2011. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strain for sustainable biofuel production. *Bioresource Technology* 102, 57-70.

Chisti, Y., 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 26, 126-131.

Li, Y., Horsman, M., Dubois-Calero, N., 2008. Articles: Biocatalysts and Bioreactor design. *Biotechnol. Prog.* 24,815-820.

Khan, S.A., Rashmi, Hussain, M.Z., Prasad, S., Banerjee, U.C., 2009. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13, 2361-2372.

Duku, H., Gu, S., Hagan B.E., 2010. A comprehensive review of biomass resources and Biofuels potential in Ghana. *Renewable and Sustainable Energy*. Article in press.

Harun, R., Singh, M., Forde, G.M., Danquah, M.K., 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 1037-1047.

Converti, A., Casazza A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., 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, 1146-1151.

Scragg, A.H., Illman, A.M., Carden, A., Shales, S.W., 2002. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy* 23, 67-73.

Packer, A., Li, Y., Andersen, T., Hu, Q., Kuang, Y., Sommerfeld, M., 2011. Growth and neutral lipid synthesis in green microalgae: A mathematical model. *Bioresource Technology* 102, 111-117.

Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T.C., Ng, K.Y., Salley, S.O., 2011. Effect of nutrient on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology* 102, 1649-1655.

De la Hoz, S, H., Ben-Zvi, A., Burrell, R.E., McCaffrey, W.C., 2011. The dynamics of heterotrophic algal cultures. *Bioresource Technology* 102, 5764-5774.

Pittman, j, k., Dean, A, P., Osundeko, O., 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology* 102, 17-25.

Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., 2009. Microalgae for oil, Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 102, No. 1.

Amaro, H.M., Guedes, A.C., Malcata, F.X., 2011. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*. Article in press.

Sarmidi, A., 2009. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Conversion and Management* 50, 1834-1840.

Yoo, C., Jun, S.Y., Lee, J.Y., Ahn, C.Y., Oh, H.M., 2010. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology* 101, S71-S74.

Raetz, K., 2009. Challenges and Advances in Making Microalgae Biomass a Cost Efficient Source of Biodiesel. *MMG 445 Basic Biotechnology* 5:37-43.

Gao, C., Zhai, Y., Ding, Y., Wu, Q., 2010. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*.

Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O., 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances* 27, 409-416.

Lee, J.Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C.Y., Oh, H.M., 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology* 101, S75-S77.

Li, X., Hu, H.Y., Gan, K., Sun, Y.X., 2010a. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth nutrient uptake, and lipid accumulation of freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101, 5494-5500.

Li, X., Hu, H.Y., Jia, Y., 2010b. Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1 growing in secondary effluent. *Biotechnology* Vol. 27, No. 1.

Li, X., Hu, H.Y., Zhang, Y.P., 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology* 102, 3098-3102.

Li, Yantao, Han, D., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2011. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited

Griffiths, M.J., Harrison S.T.L., 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 21: 493-507.

Oltra, C.,2011. Stakeholder perceptions of Biofuels from microalgae. *Energy Policy* 39, 1774-1781.

Rawat, I., Kumar, R.R., Mutanda, T., Bux, F., 2010. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable Biofuels production. *Applied Energy*. Article in press.

Zhang, X., Hu, Q., Sommerfeld, M., Puruhito, E., Chen, Y., 2010. Harvesting algal biomass for Biofuels using ultrafiltration membranes. *Bioresource Technology* 101, 5297-5304.

Siddiquee, M.N., Rohani, S., 2011. Lipid extraction and biodiesel production from municipal sewage sludges: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15, 1067-1072.

Mohammad, H.M., Rasoul-Amini, S., Ghasemi, Y., 2010. *Chlamydomonas* as a “new” organism for biodiesel production. *Bioresource Technology* 101, 2059-2062.

Deng, X., Fei, X., Li, Y., 2011. The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*. *African Journal Of Microbiology Research* Vol. 5(3) pp. 260-270

Widjaja, A., Chien, C.C., Ju, Y.H., Study of increasing lipid from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 40, 13-20.

Feng, d., Chen, Z., Xue, S., Zhang, W., 2011. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. *Bioresource Technology* 102, 6710-6716.

Guschina, I.A., Harwood, J.L., 2006 Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in lipid Research* 45, 160-186

Lian, Q., Lin, J., 2011. Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. *Bioresource Technology* 102, 1615-1621.

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* 101, 6797-6804.

Hsieh, C.H., Wu, W.T., 2009 Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresource Technology* 100, 3921-3926.

Chiu, S.Y., Kao, C.Y., Tsai, M.T., Ong, S.C., Chen, C.H., Lin, C.S., 2009. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technology* 100, 833-838.

Lin, Y.H., Chang, F.L., Tsao, C.Y., Leu, J.Y., 2007. Influence of growth phase nutrient source on fatty acid composition of *Isochrysis galbana* CCMP 1324 in a batch photoreactor. *Biochemical Engineering Journal* 37, 166-176.

Guevara, M., Lodeiros, C., Gómez, O., Lemus, N., Núñez, P., Romero, L., Vásquez, A., Rosales, N., 2005. Carotenogenesis de cinco cepas de alga *Dunaliella* sp. (Chlorophyceae) aislada de lagunas hipersalinas de Venezuela. *Revista de Biología Tropical* 55,7.

Feng Yujie, Li, c., Zhang, D., 2011. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultures in artificial wastewater medium. *Bioresource Technology* 102, 101-105.

Miao, X., Wu, Q., 2004. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of Biotechnology* 110, 85-93.

Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R., Núñez-Cebrero, F., 2002. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis galbana* (clone T-also) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacult. Eng.*, 25, 207-216.

Valenzuela- Espinoza, E., Lafarga – De la cruz, F., Millán-Núñez, R., Núñez-Cebrero, F., 2005. Crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Rhodomonas sp.* cultivada con medio f/2 y fertilizante agrícola. *Ciencias Marinas* 31, 79-89.

Bulut, Y.M., Isik, O., Uslu, L., Koc, K., Durmaz, Y., 2011. The effects of nitrogen and phosphorus deficiencies and nitrate addition on the content of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(3), pp 453-456.

Mandal S., Mallick, N., 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 84(2), 281-91.