

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DESARROLLO DE UN PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE  
MICROALGAS CAPACES DE SINTETIZAR LÍPIDOS DE BAJO PESO  
MOLECULAR EN UN FOTOBIORREACTOR TIPO**

**AIR-LIFT**

**POR**

**ITURIEL ALEJANDRO VARGAS SALDAÑA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

**NOVIEMBRE, 2016**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DESARROLLO DE UN PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE  
MICROALGAS CAPACES DE SINTETIZAR LÍPIDOS DE BAJO PESO  
MOLECULAR EN UN FOTOBIORREACTOR TIPO**

**AIR-LIFT**

**POR**

**ITURIEL ALEJANDRO VARGAS SALDAÑA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

**SAN NICOLÁS DE LOS GARZA NUEVO LEÓN, MÉXICO**

**NOVIEMBRE 2016**

**DESARROLLO DE UN PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE  
MICROALGAS CAPACES DE SINTETIZAR LÍPIDOS DE BAJO  
PESO MOLECULAR EN UN FOTOBIORREACTOR TIPO  
AIR-LIFT**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

Por

ITURIEL ALEJANDRO VARGAS SALDAÑA

Comité de tesis:

---

Dra. Myriam Elías Santos  
Presidente

---

Dra. Isela Quintero Zapata  
Secretario

---

Dra. Guadalupe Rojas Verde  
Vocal

---

Dr. Hugo A. Luna Olvera  
Vocal

---

Dr. Sergio Salcedo Martínez  
Vocal

**DESARROLLO DE UN PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE  
MICROALGAS CAPACES DE SINTETIZAR LÍPIDOS DE BAJO  
PESO MOLECULAR EN UN FOTOBIORREACTOR TIPO  
AIR-LIFT**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

Por

ITURIEL ALEJANDRO VARGAS SALDAÑA

Dirección de tesis:

---

Dra. Myriam Elías Santos  
Director

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por brindarme un espacio y equipo dentro del laboratorio L2 del Instituto de Biotecnología, sin el cual no podría haber sido posible la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo recibido para la realización de este trabajo, por medio de la beca # 263876

Al Doctor Hugo Alberto Luna Olvera por compartirme su amplio conocimiento, por su amistad y por guiarme durante mi trayectoria y crecimiento profesional y personal, primero como alumno de servicio social, luego como tesista de Licenciatura y ahora como tesista de Doctorado, sus enseñanzas y consejos siempre los voy a tener presente y nunca los olvidaré. ¡Muchas gracias Doctor!

A la Dra. Myriam Elías Santos por sus consejos y apoyo incondicional durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Sergio Salcedo Martinez por su tiempo, comentarios y recomendaciones para enriquecer este trabajo.

A la Dra. Azucena Gonzalez que siempre me apoyó con su guía profesional.

A la QBP Magda Patricia Vargas Perez por su valiosa participación profesional para la realización de este trabajo.

A todos y cada uno de los alumnos de servicio social, voluntarios y tesistas que participaron en alguna de las etapas de este proyecto.

A mis amigos y compañeros que me compartieron su alegría y amistad Luis Enrique "Luisito", Liliana Orrantia, Magda Vargas, Hiram Mendoza, Nora Patricia, Guillermo Matamoros, Dalila Castillo, Silvia Iracheta, Antonio Fuentes, Mayra Treviño, Emanuel Garza, Omar Tovar, Fernando Ornelas. Muchas Gracias!!

A todas las personas del Instituto de Biotecnología (FCB – UANL) que directa o indirectamente me ayudaron en la realización del presente trabajo de tesis.

Nuevamente gracias, a todos aquellos que no mencioné su nombre, pero sin embargo, sé que sentirán alusión.

## **DEDICATORIA**

A **Dios** que es Todo poderoso, que siempre esta conmigo y me fortalece

A mi Esposa Nazareth, por su apoyo y amor

A mis Hijos

A mis Padres y Hermanos

¡Con Dios podemos alcanzarlo todo y mucho más de lo que imaginamos!

# ÍNDICE

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

<b>1.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.2 ANTECEDENTES</b> .....	3
1.2.1. Definición de biocombustible.....	3
1.2.1.1. Biocombustibles de primera generación.....	5
1.2.1.2. Biocombustibles de segunda generación.....	6
1.2.1.3. Biocombustibles de tercera generación.....	7
1.2.1.4. Biocombustibles de cuarta generación.....	8
1.2.2. Tipos de biocombustibles.....	8
1.2.3. Microalgas definición.....	14
1.2.3.1. Ventajas de las microalgas.....	17
1.2.3.2. Desventajas de las microalgas.....	19
1.2.3.3. Colecta de microalgas.....	21
1.2.3.4. Aislamiento de microalgas.....	21
1.2.3.5. Cultivo de microalgas.....	21
1.2.4. Producción de microalgas.....	22
1.2.4.1. Sistemas abiertos.....	23
1.2.4.2. Ventajas de sistemas abiertos.....	23
1.2.4.3. Desventajas de sistemas abiertos.....	24
1.2.4.4. Sistemas cerrados o fotobiorreactores (FBR´s).....	24
1.2.4.5. Ventajas de sistemas cerrados o fotobiorreactores (FBR´s).....	26
1.2.4.6. Desventajas de sistemas cerrados o fotobiorreactores (FBR´s).....	26
1.2.4.7. Fotobiorreactor air lift.....	26
1.2.5. Condiciones de crecimiento.....	28
1.2.5.1. Determinación de temperatura.....	29
1.2.5.2. Determinación de luz.....	30
1.2.5.3. Requerimiento de nitrato y fosfato.....	32
1.2.5.4. Condiciones de estrés.....	33
1.2.6. Cosecha.....	35
1.2.7. Lípidos.....	37
1.2.7.1. Detección de lípidos.....	37
1.2.7.2. Determinación de lípidos polares y neutros.....	37
1.2.7.3. Extracción de lípidos.....	38
1.2.8. Procesamiento final y uso de co-productos.....	38
<b>1.3 JUSTIFICACIÓN</b> .....	40
<b>1.4 HIPÓTESIS</b> .....	42
<b>1.5 OBJETIVOS</b> .....	43
<b>1.5.1. OJETIVO GENERAL</b> .....	43
<b>1.5.2. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	43

**CAPÍTULO 2: AISLAMIENTO, CULTIVO, SELECCIÓN DE CEPAS  
LIPÍDICAS MEDIANTE TINCIÓN CON SUDAN IV Y ESTABLECIMIENTO  
DE CEPARIO**

<b>2.1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>44</b>
<b>2.2 MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
2.2.1. Descripción de los sitios.....	47
2.2.2. Aislamiento.....	49
2.2.2.1. Antibióticos.....	50
2.2.2.2. Método de estría cruzada (íslamiento).....	52
2.2.2.3. Método de pipeta capilar (aislamiento).....	53
2.2.3. Cultivo (Medio de crecimiento).....	53
2.2.4. Detección de lípidos (Sudan IV).....	54
2.2.5. Establecimiento y mantenimiento de cepario .....	55
<b>2.3 RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
2.3.1. Muestras colectadas.....	56
2.3.1.1. Muestras de microalgas al microscopio.....	57
2.3.2. Aislamiento y establecimiento de cepario.....	60
2.3.2.1. Fotos de cepas aisladas.....	60
2.3.2.2. Cepario.....	72
2.3.3. Cepas seleccionadas.....	74
<b>2.4 DISCUSIÓN.....</b>	<b>83</b>
2.4.1. Aislamiento.....	83
2.4.2. Cultivo.....	84
2.4.3. Selección de cepas lipídicas mediante Sudan IV.....	85
2.4.4. Establecimiento de cepario.....	85
<b>2.5 CONCLUSIÓN.....</b>	<b>87</b>



**CAPÍTULO 3. DISEÑO DE FOTOBIORREACTOR, OPTIMIZACIÓN DE  
CRECIMIENTO Y DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS NEUTROS MEDIANTE LA  
SONDA FLUORESCENTE ROJO NILO EN CEPAS SELECCIONADAS SIN ESTRÉS**

<b>3.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>88</b>
<b>3.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>91</b>
3.2.1. Diseño de fotobiorreactor.....	91
3.2.2. Optimización de crecimiento.....	91
3.2.3. Medición de lípidos neutros.....	91
<b>3.3. RESULTADOS.....</b>	<b>94</b>
3.3.1. Fotobiorreactor.....	94
3.3.2. Crecimiento celular.....	95
3.3.2.1. Efecto del nivel de luz sobre el crecimiento celular a 25°C.....	95
3.3.2.2. Efecto del nivel de temperatura sobre el crecimiento celular a 32°C.....	107
3.3.2.3. Efecto del fosfato y nitrato sobre el crecimiento celular.....	110
3.3.2.3.1. Efecto de alta concentración de fosfato y nitrato .....	110
3.3.2.3.2. Efecto de baja concentración de fosfato y nitrato.....	113
3.3.2.3.3. Efecto de baja, media y alta concentración de fosfato y nitrato.....	116
3.3.3. Determinación de lípidos neutros.....	119
3.3.3.1. Determinación de lípidos neutros en cepas sin estrés.....	120
<b>3.4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>130</b>
3.4.1. Evaluación de fotobiorreactor tipo Air lift.....	130
3.4.2. Evaluación de crecimiento celular a diferentes temperaturas.....	131
3.4.3. Evaluación de crecimiento celular a dif. concentraciones de fosfato y nitrato.....	133
3.4.4. Evaluación de crecimiento celular a diferentes intensidades de luz.....	134
3.4.5. Evaluación de lípidos neutros en cepas sin estrés a 25°C.....	135
<b>3.5. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>137</b>

## **CAPÍTULO 4. DETERMINACIÓN DE CONDICIONES ÓPTIMAS DE ESTRÉS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS NEUTROS**

<b>4.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>138</b>
<b>4.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>140</b>
4.2.1. Contenido de lípidos neutros (método fluorométrico).....	140
4.2.2. Experimento con luz.....	140
4.2.3. Experimento con temperatura.....	141
4.2.4. Experimento con nutrientes.....	141
<b>4.3. RESULTADOS.....</b>	<b>142</b>
4.3.1. Efecto del nivel de luz y temperatura en el contenido de lípidos.....	143
4.3.1.1. Efecto del nivel de luz a 445 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a 25 y 32°C.....	143
4.3.1.2. Efecto del nivel de luz a 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a 25 y 32°C.....	168
4.3.1.3. Efecto del nivel de luz a 490 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a 25 y 32°C.....	172
4.3.2. Efecto de fosfato y nitrato en el contenido de lípidos.....	176
4.3.2.1. Efecto de nivel alto de fosfato y nitrato a 445 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a 25 y 32°C.....	176
4.3.2.2. Efecto de nivel alto de fosfato y nitrato a 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a 25 y 32°C.....	180
4.3.2.3. Efecto de nivel alto de fosfato y nitrato a 490 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a 25 y 32°C.....	182
4.3.2.4. Efecto de nivel bajo de P y Na a 445 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ en el contenido de lípidos.....	184
4.3.2.5. Efecto de nivel bajo de P y N a 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ en el contenido de lípidos.....	190
4.3.2.6. Efecto de nivel bajo de P y N a 490 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ en el contenido de lípidos.....	192
4.3.2.7. Comparativo de cepas con <i>N. oleoabundans</i> UTEX 1185 bajo estrés.....	194
<b>4.4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>202</b>
4.4.1. Determinación de condiciones de estrés.....	202
4.4.2. Evaluación de lípidos neutros a diferente intensidad lumínica a 25°C.....	203
4.4.3. Evaluación de lípidos neutros a diferente temperatura.....	203
4.4.4. Evaluación de lípidos neutros a 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a 25 y 32°C.....	204
4.4.5. Evaluación de lípidos neutros a 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a 25 y 32°C.....	205
4.4.6. Evaluación de lípidos neutros a diferentes concentraciones de P y N.....	206
<b>4.5. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>208</b>

## **CAPÍTULO 5. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES Y PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS**

<b>5.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>209</b>
<b>5.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>211</b>
5.2.1. Extracción de lípidos totales (método gravimétrico).....	211
5.2.2. Perfil de ácidos grasos.....	211
<b>5.3. RESULTADOS.....</b>	<b>213</b>
5.3.1. Método gravimétrico.....	213
5.3.2. Perfil de ácidos grasos.....	219
<b>5.4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>226</b>
5.4.1. Extracción de lípidos totales (método gravimétrico).....	226
5.4.2. Perfil de ácidos grasos.....	228
<b>5.5 CONCLUSIÓN.....</b>	<b>233</b>
<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>234</b>
<b>7. REFERENCIAS.....</b>	<b>235</b>
<b>RESUMEN BIOGRÁFICO.....</b>	<b>252</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Emisiones de gases de efecto invernadero del transporte .....	25
<b>Figura 2.</b> Productividad de aceite de las microalgas en comparación con.....	25
los cultivos convencionales	
<b>Figura 3.</b> Raceway Pond.....	25
<b>Figura 4.</b> Tipos de fotobiorreactores .....	25
<b>Figura 5.</b> Fotobiorreactor Air lift.....	28
<b>Figura 6.</b> Sitios de colecta (municipios de Nuevo León).....	48
<b>Figura 7.</b> Sitios de colecta (Estados de México).....	49
<b>Figura 8.</b> Sistema de filtración.....	51
<b>Figura 9.</b> Método de aislamiento.....	53
<b>Figura 10.</b> Muestras colectadas de 29 municipios.....	57
<b>Figura 11.</b> Imagen de muestras conteniendo distintos géneros de microalgas.....	60
<b>Figura 12.</b> Imagen de cepas aisladas y de la cepa de referencia <i>N. oleoabundans</i> .....	72
<b>Figura 13.</b> Cepario.....	73
<b>Figura 14.</b> Shakers con luz artificial conteniendo las cepas aisladas.....	73
<b>Figura 15.</b> Cepas aisladas en cultivos sólidos.....	74
<b>Figura 16.</b> Detección de lípidos mediante el reactivo Sudan IV.....	82
<b>Figura 17.</b> Hemocitómetro.....	92
<b>Figura 18.</b> Prototipo de fotobiorreactor tipo Air lift.....	94
<b>Figura 19.</b> Modo de acción del sistema Air lift.....	95
<b>Figura 20.</b> Efecto del nivel de luz sobre el crecimiento celular en las cepas A12, A14 y A20a $445 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a $25^{\circ}\text{C}$ .....	96
<b>Figura 21.</b> Cepa A12 en el fotobiorreactor sin mostrar adherencia.....	97
<b>Figura 22.</b> Fotobiorreactores sofisticados y de diseño arquitectónico futurista.....	98
<b>Figura 23.</b> Efecto del nivel de luz sobre el crecimiento celular en las cepas A1, A3, A18 y A35a $445 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a $25^{\circ}\text{C}$ .....	98
<b>Figura 24.</b> Efecto del nivel de luz sobre el crecimiento celular en las cepas A38,.....	100

A47 y A43a $445 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a $25^{\circ}\text{C}$	
<b>Figura 25.</b> Efecto del nivel de luz sobre el crecimiento celular en las cepas A29, A37, A52 y A54a $445 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a $25^{\circ}\text{C}$	101
<b>Figura 26.</b> Efecto del nivel de luz sobre el crecimiento celular en las cepas A33, A61 y A25a $445 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a $25^{\circ}\text{C}$	102
<b>Figura 27.</b> Efecto del nivel de luz sobre el crecimiento celular en las cepas A4, A58, A40 y A46 a $445 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a $25^{\circ}\text{C}$	103
<b>Figura 28.</b> Efecto de los distintos niveles de luz sobre el crecimiento celular en la cepa A46 a $90,445$ y $490\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a $25^{\circ}\text{C}$	104
<b>Figura 29.</b> Efecto de los distintos niveles de luz sobre el crecimiento celular en la cepa A43 a $90,445$ y $490\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a $25^{\circ}\text{C}$	105
<b>Figura 30.</b> Efecto de los distintos niveles de luz sobre el crecimiento celular en la cepa A35a $90,445$ y $490\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a $25^{\circ}\text{C}$	106
<b>Figura 31.</b> Cepa A35 en fotobiorreactores Air lift a diferentes intensidades de luz	107
<b>Figura 32.</b> Efecto del Nivel de Temperatura sobre el Crecimiento Celular en las cepas A9, A12, A14, A20, A29, A58, A35, A61 y A46 a $32^{\circ}\text{C}$	109
<b>Figura 33.</b> Efecto del Nivel de Temperatura sobre el Crecimiento Celular en las cepas A38, A40, A33, A47, A1, A54, A43 y A52 a $32^{\circ}\text{C}$	110
<b>Figure 34.</b> Efecto de la concentración alta de Nitrato ( $\text{NaNO}_3$ $14.71\text{mM}$ ) y Fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ $6.42\text{mM}$ ) a $25^{\circ}\text{C}$ sobre el crecimiento celular en las cepas A12, A14, A18, A35 y A20	111
<b>Figure 35.</b> Efecto de la concentración alta de Nitrato ( $\text{NaNO}_3$ $14.71\text{mM}$ ) y Fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ $6.42\text{mM}$ ) a $25^{\circ}\text{C}$ sobre el crecimiento celular en las cepas A4, A33 y A25	112
<b>Figure 36.</b> Efecto de la concentración alta de Nitrato ( $\text{NaNO}_3$ $14.71\text{mM}$ ) y Fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ $6.42\text{mM}$ ) a $25^{\circ}\text{C}$ sobre el crecimiento celular en la cepa A43	112
<b>Figura 37.</b> Efecto de la concentración baja de Nitrato ( $\text{NaNO}_3$ $1.47\text{mM}$ ) y Fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ $0.642\text{mM}$ ) a $25^{\circ}\text{C}$ sobre el crecimiento celular en las cepas A12, A14, A18 y A43	114

<b>Figura 38.</b> Efecto de la concentración baja de Nitrato ( $\text{NaNO}_3$ 1.47mM) y Fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.642mM) a 25°C sobre el crecimiento celular en las cepas A4, A33 y A25	114
<b>Figura 39.</b> Efecto de la concentración baja de Nitrato ( $\text{NaNO}_3$ 1.47mM) y Fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.642mM) a 25°C sobre el crecimiento celular en las cepas A35 y A20	115
<b>Figura 40.</b> Efecto de las distintas concentraciones de Fosfato (0.642, 1.29 y 6.42mMol) y Nitrato (1.47, 2.94 y 14.71mMol) sobre el crecimiento celular en la cepa A204 y en la cepa de referencia <i>N. oleoabundans</i> UTEX 1185 a 25 °C	118
<b>Figura 41.</b> Efecto de las distintas concentraciones de Fosfato (0.642, 1.29 y 6.42mMol) y Nitrato(1.47, 2.94 y 14.71mMol) sobre el crecimiento celular en la cepa A204 y en la cepa de referencia <i>N. oleoabundans</i> UTEX 1185 a 32 °C	118
<b>Figura 42.</b> Control positivo Rojo Nilo.....	119
<b>Figura 43.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A1, A3 y A9 sin estrés (intensidad lumínica $32 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ )	121
<b>Figura 44.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A12, A14 y A20 sin estrés (intensidad lumínica $32 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ )	123
<b>Figura 45.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A25, A29 y A33 sin estrés (intensidad lumínica $32 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ )	124
<b>Figura 46.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A35, A37 y A38 sin estrés (intensidad lumínica $32 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ )	125
<b>Figura 47.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A40, A44 y A43 sin estrés (intensidad lumínica $32 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ )	126
<b>Figura 48.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A46, A47 y A52 sin estrés (intensidad lumínica $32 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ )	128
<b>Figura 49.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A54, A58 y A61 sin estrés (intensidad lumínica $32 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ )	129

<b>Figura 50.</b> Cepa A4 con y sin estrés	142
<b>Figura 51.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A1, A3 y A9 en condiciones bajo estrés (intensidad lumínica $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a $25^\circ\text{C}$ )	145
<b>Figura 52.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A12, A14 y A20 en condiciones bajo estrés (intensidad lumínica $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a $25^\circ\text{C}$ )	146
<b>Figura 53.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A35, A29 y A37 en condiciones bajo estrés (intensidad lumínica $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a $25^\circ\text{C}$ )	151
<b>Figura 54.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A38, A47 y A52 en condiciones bajo estrés (intensidad lumínica $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a $25^\circ\text{C}$ )	152
<b>Figura 55.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A54, A43 y A4 en condiciones bajo estrés (intensidad lumínica $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a $25^\circ\text{C}$ )	153
<b>Figura 56.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A33, A58 y la cepa de referencia <i>N. oleoabundans</i> UTEX 1185 en condiciones bajo estrés (intensidad lumínica $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a $25^\circ\text{C}$ )	154
<b>Figura 57.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A25, A40 y A46 en condiciones bajo estrés (intensidad lumínica $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a $25^\circ\text{C}$ )	156
<b>Figura 58.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepa seleccionada A204 y en la cepa de referencia <i>N. oleoabundans</i> UTEX 1185 en condiciones bajo estrés (intensidad lumínica $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a $25^\circ\text{C}$ )	157
<b>Figura 59.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas	160

A9, A12 y A14 en condiciones bajo estrés (intensidad lumínica 445 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a 32°C)	
<b>Figura 60.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas	161
A20, A29 y A58 en condiciones bajo estrés (intensidad lumínica 445 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a 32°C)	
<b>Figura 61.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas	164
A61, A38 y A40 en condiciones bajo estrés (intensidad lumínica 445 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a 32°C)	
<b>Figura 62.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas	165
A33, A47 y A1 en condiciones bajo estrés (intensidad lumínica 445 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a 32°C)	
<b>Figura 63.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas	167
A54, A52 y en la cepa de referencia <i>N. oleoabundans</i> UTEX 1185 en condiciones bajo estrés (intensidad lumínica 445 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a 32°C)	
<b>Figura 64.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas	168
A204 en condiciones bajo estrés (intensidad lumínica 445 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a 32°C)	
<b>Figura 65.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas	170
A9, A43 y A35 en condiciones bajo estrés (intensidad lumínica 90 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a 25°C)	
<b>Figura 66.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepa seleccionada	171
A46 en condiciones bajo estrés (intensidad lumínica 90 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a 25°C) y A35 y A43 en condiciones bajo estrés (intensidad lumínica 90 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a 32°C)	
<b>Figura 67.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas	174
A9, A35 y A43 en condiciones bajo estrés (intensidad lumínica	



490 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a 25°C)	
<b>Figura 68.</b> Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A46 y A43 en condiciones bajo estrés (intensidad lumínica 490 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a 32°C)	175
<b>Figura 69.</b> Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A204 y en la cepa de referencia <i>N. oleoabundans</i> UTEX 1185 en condiciones de estrés (intensidad lumínica 445 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 14.71 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 6.42 mMol a 25 y 32°C)	178
<b>Figura 70.</b> Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A18, A4 y A33 en condiciones de estrés (intensidad lumínica 445 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 14.71 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 6.42 mMol a 25°C)	179
<b>Figura 71.</b> Determinación de lípidos neutros en la cepa de referencia <i>N. oleoabundans</i> UTEX 1185 en condiciones de estrés (intensidad lumínica 90 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 14.71 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 6.42 mMol a 25 y 32°C)	181
<b>Figura 72.</b> Determinación de lípidos neutros en la cepa de referencia <i>N. oleoabundans</i> UTEX 1185y A43 en condiciones de estrés (intensidad lumínica 490 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 14.71 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 6.42 mMol a 25 y 32°C)	183
<b>Figura 73.</b> Determinación de lípidos neutros en la cepa de referencia <i>N. oleoabundans</i> UTEX 1185 y A204 en condiciones de estrés (intensidad lumínica 445 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 1.47 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.642 mMol a 25°C)	186
<b>Figura 74.</b> Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A14, A18 y A4 en condiciones de estrés (intensidad lumínica 445 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 1.47 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.642 mMol a 25°C)	187
<b>Figura 75.</b> Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A33, A25 y A20 en condiciones de estrés (intensidad lumínica 445 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 1.47 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.642 mMol a 25°C)	189

<b>Figura 76.</b> Determinación de lípidos neutros en la cepa de referencia <i>N. oleoabundans</i> UTEX 1185 y A35 en condiciones de estrés (intensidad lumínica 90 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 1.47 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.642 mMol a 25 y 32°C)	191
<b>Figura 77.</b> Determinación de lípidos neutros en la cepa de referencia <i>N. oleoabundans</i> UTEX 1185 y A43 en condiciones de estrés (intensidad lumínica 490 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , $\text{NaNO}_3$ 1.47 mMol y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.642 mMol a 25 y 32°C)	193
<b>Figura 78.</b> Comparativo de las cepas A9, A35, A43 y A46 con la cepa de referencia <i>N. oleoabundans</i> UTEX 1185 bajo 3 intensidades lumínicas diferentes	195
<b>Figura 79.</b> Efecto de diferentes condiciones de estrés sobre la cepa de referencia <i>N. oleoabundans</i> UTEX 1185	197
<b>Figura 80.</b> Efecto de diferentes condiciones de estrés sobre las cepas de mayor producción de lípidos (A4, A18, A33, A43 y A52)	199
<b>Figura 81.</b> Efecto de 2 condiciones de estrés sobre la cepa A12	200
<b>Figura 82.</b> Lípidos extraídos de las distintas cepas de microalgas	215
<b>Figura 83.</b> Cromatograma de ácido graso de la cepa A33 bajo condiciones de estrés	219
<b>Figura 84.</b> Cromatograma de ácido graso de la cepa A4 bajo condiciones de estrés	220
<b>Figura 85.</b> Cromatograma de ácido graso de la cepa A18 bajo condiciones de estrés	221
<b>Figura 86.</b> Cromatograma de ácido graso de la cepa A43 sin estrés	222
<b>Figura 87.</b> Cromatograma de ácido graso de la cepa A43 bajo condiciones de estrés	224
<b>Figura 88.</b> Cromatograma de ácido graso de la cepa de referencia <i>N. oleoabundans</i> UTEX 1185 bajo condiciones de estrés	225

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tipos de combustible para la aviación comercial y militar.....	14
<b>Tabla 2.</b> Especies cultivadas comercialmente como fuente de diversos productos.....	16
de alto valor agregado	
<b>Tabla 3.</b> Antibióticos para purificación de microalgas.....	51
<b>Tabla 4.</b> Compuestos y cantidades de reactivos para medio Bristol.....	54
<b>Tabla 5.</b> Productividad y contenido biomasa/lípido en las cepas seleccionadas de... ..	216
microalgas	
<b>Tabla 6.</b> Comparación del contenido lipídico determinado por gravimetría.....	218
e intensidad de fluorescencia	
<b>Tabla 7.</b> Lípidos identificados en la muestra A33 bajo condiciones de estrés.....	220
<b>Tabla 8.</b> Lípidos identificados en la muestra A4 bajo condiciones de estrés.....	220
<b>Tabla 9.</b> Lípidos identificados en la muestra A18 bajo condiciones de estrés.....	222
<b>Tabla 10.</b> Lípidos identificados en la muestra A43 sin estrés.....	222
<b>Tabla 11.</b> Lípidos identificados en la muestra A43 bajo condiciones de estrés.....	224
<b>Tabla 12.</b> Lípidos identificados en la muestra de referencia <i>N. oleoabundans</i> .....	225
UTEX 1185 bajo condiciones de estrés	

## ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ASTM	Sociedad Americana para Pruebas y Materiales
DOE	Departamento de Energía
dH <sub>2</sub> O	Agua destilada
Cél	Células
cm	Centímetros
CG	Cromatografía de gases
DMSO	Dimetilsulfóxido
$\epsilon$	Período de luz/ciclo de tiempo
F.A.M.E.	Éster Metílico de Ácidos Grasos
FBR	Fotobiorreactor
°C	Grados centígrados
gr	gramos
IF	Intensidad de Fluorescencia
Kg	Kilogramos
L	Litro
LED	Diodos Emisores de Luz
$\mu$ l	Microlitros
$\mu$ mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Micromol por metro cuadrado por segundo
mg	Miligramos
mL	Mililitros
min	Minutos
nm	Nanómetros
N	Norte
N.L.	Nuevo León
Oeste	Oeste
OD	Densidad Óptica
PFD	Densidad de Flujo de Fotones

ppm	Partes por millón
pH	Potencial de Hidrógeno
Prod.	Producción
Rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
<i>sp.</i>	Especie
tc	Ciclos de luz/oscuridad
u.a	Unidades arbitrarias
UV-VIS	Ultravioleta-Visible
USA	Estados Unidos de América
V	Volúmen

## RESUMEN

Un reto que restringe el uso de microalgas en la industria de los biocombustibles es el crecimiento y la acumulación de lípidos. Las microalgas con características de un alto crecimiento tienen más probabilidades de originarse en el medio ambiente local. Sin embargo, para ser comercialmente eficaces, además de un alto crecimiento, también deben tener productividades lipídicas elevadas y contener los ácidos grasos deseados para el uso intencionado. Hemos colectado un total de 350 muestras de microalgas de los ambientes naturales, incluyendo el agua, las rocas y el suelo. Así como también de ambientes extremos como aguas termales y la importante reserva ecológica, hogar de varios organismos endémicos, en el desierto del estado de Coahuila (4 Ciénegas), abarcando un total de 29 municipios de 9 estados de la República Mexicana.

Se lograron aislar 70 diferentes cepas de microalgas provenientes de microambientes con condiciones adversas o fluctuantes, ya que pueden albergar más cepas oportunistas con alto potencial de acumulación de lípidos. El “Screening” se basó en un protocolo estándar utilizando la tasa de crecimiento y la acumulación de lípidos, así como la priorización de perfiles de ácidos grasos adecuados para la generación de biocombustibles. Utilizando estos criterios, una selección inicial de 70 cepas de microalgas obtenidas de los distintos ambientes naturales, fue reducida a 23 cepas consideradas adecuadas para investigación adicional. Entre estas 23 cepas, las más prometedoras de ser eficaces para la producción de biocombustibles fueron 5 siendo la A4 con un 36.66% de lípidos, A18 con un 28.31% de lípidos, A33 con un 33.3% de lípidos, A43 con un 55.30% de lípidos, y A52 con un 27.70% de lípidos en peso seco, con una longitud de sus cadenas ácidos grasos entre 14:0 – 18:2 carbonos los cuales son preferibles para la producción de biocombustibles, Los ácidos grasos saturados C14, C16 y C18 y ácidos grasos insaturados tales como C16:1, C16:2, C18:1 y C18: 2 son los más importantes para producir una buena calidad de biodiesel. Esto se debe a que los otros ácidos grasos insaturados con 3 o 4 dobles enlaces tienen una estabilidad reducida de almacenamiento. Por lo tanto estas cepas tienen potencial para futuras investigaciones en su utilización para la generación de biocombustibles.

## ABSTRACT

One challenge that restricts the use of microalgae in the biofuels industry is the growth and accumulation of lipids. Microalgae with characteristics of high growth are more likely to originate in the local environment. However, in order to be commercially effective, in addition to high growth, they must also have high lipid productivities and contain the desired fatty acids for the intended use. We have collected a total of 350 samples of microalgae from natural environments, including water, rocks and soil. As well as extreme environments such as hot springs and the important ecological reserve, home to several endemic organisms, in the desert of the state of Coahuila (4 Cienegas), comprising a total of 29 towns from 9 states of the Mexico.

It was possible to isolate 70 different strains of microalgae from microenvironments with adverse or fluctuating conditions, as they may harbor more opportunistic strains with high potential for lipid accumulation. Screening was based on a standard protocol using growth rate and lipid accumulation as well as the prioritization of fatty acid profiles suitable for the generation of biofuels. Using these criteria, an initial selection of 70 strains of microalgae obtained from the different natural environments was reduced to 23 strains considered suitable for further investigation. Among these 23 strains, the most promising to be effective for the production of biofuels were 5 with A4 being 36.66% lipids, A18 with 28.31% lipids, A33 with 33.3% lipids, A43 with 55.30% lipids, and A52 with 27.70% lipids in dry weight, with a length of their fatty acid chains between 14:0-18:2 carbons which are preferable for the production of biofuels. The saturated fatty acids C14, C16 and C18 and unsaturated fatty acids such as C16:1, C16:2, C18:1 and C18:2 are the most important for producing good quality biodiesel. This is because the other unsaturated fatty acids with 3 or 4 double bonds have a reduced storage stability. Therefore, these strains have potential for future research in their use for the generation of biofuels.

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El incremento de la demanda de combustibles en todo el mundo, reservas limitadas, la escalada en aumento de los precios del petróleo, y más significativamente, la creciente preocupación acerca del calentamiento global asociado al consumo de combustibles fósiles (Chisti, 2007). Ha impulsado a los científicos a buscar un combustible limpio y renovable en sustitución de los combustibles de origen fósil, lo que ha provocado el desarrollo de los biocombustibles. Esencialmente, en los biocombustibles que se ha invertido más esfuerzo son el bioetanol a partir del maíz y de la caña de azúcar, además del biodiesel a partir de aceite de soya, canola, girasol y palma de aceite. Sin embargo, la sustentabilidad de la producción de estos biocombustibles se ha visto fuertemente cuestionada, principalmente porque la gran demanda de ellos requiere la conversión del uso del bosques o áreas naturales en superficies agrícolas o incluso el uso de superficies actualmente utilizadas para producción de alimentos (Majer et al. 2009).

Actualmente, Los biocombustibles elaborados a partir de la biomasa de algas se están considerando como la energía alternativa más adecuada en el actual escenario global y económico. Las microalgas son conocidas por producir y acumular lípidos dentro de su masa celular, que es similar a las que se encuentran en muchos aceites vegetales. La eficiencia de la masa celular de las microalgas en la producción de lípidos se ha reportado que es más del 30% de su peso. De acuerdo al Departamento de Energía de los Estados Unidos (US DOE) las microalgas tienen el potencial para producir 100 veces más aceite por acre de tierra, que cualquier otra planta terrestre (Sing et al. 2011).

El interés por las microalgas en la producción de biocombustibles como el biodiesel, la gasolina, jet fuel (queroseno) (Lestari et al. 2009), etanol (Wangetal 2011; Matsumoto et al. 2003; Ho et al. 2013), metano e Hidrogeno (Carver et al. 2011; Lakaniemi et al. 2011; Zamalloa et al. 2011; Markou et al. 2013) se deriva de sus propiedades biológicas únicas; son más eficientes que las plantas terrestres en la conversión de luz solar en



energía bioquímica (Stephenson et al. 2011), además tienen una alta tasa de crecimiento y alto contenido de lípidos (Amaro et al. 2011; Chisti 2007; Dismukes et al. 2008; Huetal 2008; Li et al. 2008; Pienkos y Darzins 2009; Williams y Laurens 2010), mismas que pueden cultivarse en cualquier lugar que reciba la luz solar, incluyendo zonas con calidad de suelos muy pobres (desiertos). Sin embargo, la principal barrera para la comercialización de biocombustible a partir de microalgas, son los altos costos asociados a la producción de la biomasa (Brennan y Owende 2010). Por lo tanto, la selección de un modelo de producción eficiente en costos y energía jugaría un papel importante para lograr una producción de biocombustible competitivo. Esto incluye la selección de microalgas con alta producción lipídica, sitios para cultivo, técnicas de cosecha y procedimientos de extracción de aceite eficientes (Van Thang et al. 2012), además de redirigir los flujos metabólicos a la acumulación de lípidos, estableciendo condiciones de estrés fisiológico como privación de nutrientes, cambio de temperatura, aumento de la salinidad (Chisti 2013), intensidad de iluminación (Cornet y Dussap 2009; Chen et al. 2011; Takache et al. 2012). De hecho, las condiciones óptimas de cultivo dependen de la especie de microalga, cepa, medios de crecimiento, y la geometría del fotobiorreactor (Sukenik et al. 1991; Acien-Fernandez et al. 1997; Barbosa et al. 2003; Williams and Laurens. 2010). Estas condiciones son únicas para cada sistema de cultivo, y sólo obtenidas experimentalmente pueden ser confiables (R. Kandilian et al. 2014).

En este contexto, el presente trabajo propuso obtener de la naturaleza, cepas de microalgas de zonas semidesérticas en el Noreste de México, para luego evaluar la capacidad de las cepas aisladas en la producción y acumulación de lípidos en el interior de sus células y posteriormente llevar a cabo el desarrollo de un modelo en fotobiorreactor a fin de determinar los factores que influyen en su óptimo crecimiento y máxima producción de los lípidos en cada una de las cepas seleccionadas. Asimismo, esta investigación también se abocó a estudiar la fisiología de la producción de lípidos en respuesta a factores de estrés celular.

## **1.2. ANTECEDENTES**

### **1.2.1. Definición de biocombustible**

Definido en términos generales, los biocombustibles son combustibles producidos a partir de recursos renovables, derivados de la biomasa vegetal, animal o microorganismos y se denomina biocombustible tanto a los líquidos, sólidos o gases. La biomasa se ha utilizado tradicionalmente como combustible para la producción de energía en forma de leña, carbón o residuos animales. Una distinción básica es hecha entre los biocombustibles primarios no elaborados, como la leña, y los biocombustibles secundarios o procesados. Estos últimos incluyen los biocombustibles líquidos, como el bioetanol, biojet fuel y el biodiesel, los cuales han incrementado su utilización para el transporte en los últimos años.

Los biocombustibles (secundarios o procesados) son obtenidos de una amplia gama de alternativas de procedencia agrícola y están conformados por las partes alimenticias de las plantas, las cuales tienen un alto contenido de almidón, azúcares y aceites; asimismo de grasas animales, aceites y grasas de desecho provenientes de la cocción y elaboración de alimentos, así como a partir de desperdicios sólidos orgánicos; y son producidos empleando tecnología convencional como la fermentación (para azúcares y carbohidratos), la transesterificación (para los aceites y grasas), y la digestión anaerobia (para los desperdicios orgánicos). De estos procesos se obtiene bioetanol, biometanol y biobutanol (a partir de azúcares), biodiesel (a partir de los aceites), y biogás (a partir de desperdicios orgánicos) (Moschini et al. 2012; Rupert et al. 2013).

Esencialmente en los biocombustibles que se ha invertido más esfuerzo son el bioetanol a partir del maíz y de la caña de azúcar, además del biodiesel a partir de aceite de soya, canola, girasol y palma de aceite. Sin embargo, la sustentabilidad de la producción de estos biocombustibles se ha visto fuertemente cuestionada, principalmente porque la gran demanda de ellos, requiere la conversión del uso del bosques o áreas naturales en superficies agrícolas, o incluso el uso de superficies actualmente utilizadas para producción de alimentos (Majer et al. 2009).

La producción de biocombustibles en el mundo alcanzó los 105 mil millones de litros en 2010, un aumento del 17% con respecto al 2009; aún así los biocombustibles simplemente cumplen con el 2.7% de las necesidades de combustible para el transporte del mundo. Brasil y los Estados Unidos son actualmente los principales productores, que representan el 90% de la producción mundial de biocombustibles, mientras que la producción de biodiesel de la Unión Europea (UE) representa el 53% de la producción total de biodiesel a partir de 2010. La Agencia Internacional de Energía (AIE) tiene una misión para los biocombustibles, que consiste en satisfacer la demanda de la producción mundial de combustible por lo menos en una cuarta parte para el año 2050.

Un decreto emitido en el 2010 por la Unión Europea tiene como meta específica el que todos los miembros logren un 10.5% de uso de biocombustibles para el año 2020. Por otro lado India y China están explorando enormemente el uso de bioetanol y biodiesel. Actualmente, la India está expandiendo las plantaciones de *Jatropha* para ser utilizado en la producción de biodiesel. Además está estableciendo como objetivo el incorporar al menos un 5% de bioetanol en su combustible de transporte. Entretanto China, que es el mayor productor de bioetanol en Asia, tiene como tarea la incorporación del 15% de bioetanol en los combustibles para el transporte.

En los países en desarrollo, la biomasa como estiércol de ganado, madera y otros residuos agrícolas se utilizan ampliamente como combustible para calentar y cocinar. La Agencia Internacional de Energía (AIE) afirma que la energía a partir de biomasa, proporciona el 30% del suministro de energía en los países en desarrollo para más de 2 mil millones de personas. A pesar de las muchas ventajas del uso de biocombustibles para el transporte y el suministro de energía, varias cuestiones técnicas deben resolverse antes de que los biocombustibles puedan entrar en el mercado con un costo equivalente a la gasolina.

A partir de 2010 las algas de calidad alimentaria tienen un costo de \$ 5.000 Dólares/ t, esto se atribuye a los altos costos de capital y operativos, lo que puede afectar su contribución como un cultivo de biocombustibles de segunda generación. El

Departamento de Energía de Estados Unidos estima que serán necesarios 15.000 millas cuadradas de tierra para el cultivo de algas, si tiene que aumentar la sustitución de combustible convencional en los Estados Unidos. Solo los Estados Unidos consumen casi 1 millón de barriles / día de biocombustibles convencionales, y el mundo consume alrededor de 2 millones de barriles / día. Este número aumentará sin duda el doble o el triple de veces en los próximos 20-30 años. Sin embargo, la mayoría de los biocombustibles convencionales (primera generación) están altamente subsidiados por el gobierno, lo que significa que no son económicamente sostenibles, excepto el etanol de Brasil. Por lo tanto, importantes retos técnicos deben ser superados para asegurar que los biocombustibles puedan llegar a ser económicos y disponibles a gran escala en todo el mundo. El futuro de los biocombustibles depende en gran medida del precio de la biomasa y de los combustibles derivados de aceites, que a su vez aumentarán a medida que la demanda de los biocombustibles aumente. Por lo tanto, los avances tecnológicos en el desarrollo de las materias primas no alimentarias son el reto más importante que hay que resolver. (Domingos Padula et al. 2014). Los biocombustibles pueden clasificarse en función de sus tecnologías de producción: En biocombustibles de primera generación, biocombustibles de segunda generación, biocombustibles de tercera generación y los biocombustibles de cuarta generación (Demirbas 2011).

#### **1.2.1.1. Biocombustibles de primera generación**

Algunos de los insumos son de procedencia agrícola y están conformados por las partes alimenticias de las plantas, las cuales tienen un alto contenido de almidón, azúcares y aceites. Ejemplos de estas materias son el jugo de la caña de azúcar, granos de maíz, jugo de la remolacha o betabel, aceite de semilla de girasol, aceite de soya, aceite de palma, aceite de ricino, aceite de semilla de algodón, aceite de coco, aceite de maní o cacahuate, entre otros. También se emplean como insumos a las grasas animales, grasas y aceites de desecho provenientes de la cocción y elaboración de alimentos, y desperdicios sólidos orgánicos.

Los biocombustibles son producidos empleando tecnología convencional como la fermentación (para azúcares y carbohidratos), transesterificación (para los aceites y grasas), y la digestión anaerobia (para los desperdicios orgánicos). De estos procesos se obtiene bioetanol(a partir de azúcares), biodiesel (a partir de los aceites), y biogás (a partir de desperdicios orgánicos). (Moschini et al. 2012; Rupert et al. 2013).

Las ventajas de estos biocombustibles son su facilidad de procesamiento y sus bajas emisiones de gases de efecto invernadero, teniendo un balance positivo en dichas emisiones(excepto en el caso del maíz, donde el balance de estas emisiones es casi nulo), Sin embargo, la sustentabilidad de la producción de estos biocombustibles se ha visto fuertemente cuestionada, principalmente porque la gran demanda de ellos, requiere la conversión del uso del bosques o áreas naturales en superficies agrícolas, o incluso el uso de superficies actualmente utilizadas para producción de alimentos (Majer et al. 2009). Compitiendo directamente con los alimentos provocando un incremento en el precio de los mismos.

#### **1.2.1.2. Biocombustibles de segunda generación**

Los biocombustibles de segunda generación son también llamados biocombustibles avanzados (Demirbas 2011).

Los biocombustibles de segunda generación se producen a partir de materias primas no alimentarias o de biomasa celulósica de manera sustentable, lo cual es perfectamente carbono neutral y, en ciertos casos, carbono negativo, esto en cuanto a las características de impacto de las emisiones de CO<sub>2</sub>. La biomasa utilizada para la producción de biocombustibles de segunda generación son principalmente derivados de plantas como residuos agrícolas y forestales, éste es el caso del bagazo de la caña de azúcar, el rastrojo de maíz (tallo, hojas y olote), paja de trigo, aserrín, hojas, ramas secas de árboles, etcétera; y contienen gran cantidad de material lignocelulósico; siendo abundantes y baratos. En su mayoría, los materiales vegetales contienen celulosa, lignina y hemicelulosa en diferente composición dependiendo del tipo de residuo de planta. En general, la composición de los materiales vegetales muestra una fracción importante de

celulosa y hemicelulosa, que es aproximadamente del 75%. Estos polisacáridos representan una valiosa fuente de azúcares que pueden ser sometidos a fermentación microbiana o procesos químicos para producir biocombustibles. La ventaja principal en la producción de estos biocombustibles es la inexistencia de desviaciones de alimentos provenientes de la agricultura hacia el sector energético. Sin embargo la materia prima requiere de procesamiento por lo que la producción de estos biocombustibles no es rentable debido a varias cuestiones técnicas relacionadas con su producción a escala comercial (Domingos Padula et al. 2014).

### **1.2.1.3. Biocombustibles de tercera generación**

Los biocombustibles de tercera generación son también llamados biocombustibles avanzados (Demirbas 2011). Debido a muchos problemas asociados con la implementación de los biocombustibles de segunda generación, ahora se llevan a cabo iniciativas para investigar los biocombustibles de tercera generación, que principalmente hacen uso de la biomasa de algas como materia prima (John et al. 2011). La biomasa de algas se deriva tanto de las micro como de las macroalgas y contienen alta cantidad de lípidos. Tal biomasa tiene un alto potencial como precursor de biodiesel, ya que contiene hasta 70% de aceite en base a su peso seco (Demirbas 2011). Sin embargo, se debe señalar que no todas las especies de microalgas son adecuadas para la producción de biodiesel las microalgas requieren poco mantenimiento y son capaces de crecer en aguas residuales, agua no potable, agua no apta para fines agrícolas e incluso en agua de mar (Alp y Cirak 2012). La biomasa puede duplicarse en menos de un día, y su producción se puede combinar con el CO<sub>2</sub> liberado por las industrias. Las principales decisiones que han de tomarse para el establecimiento de una planta de producción de biocombustibles a base de microalgas, involucra la selección de instalaciones, ya sea de un sistema abierto o cerrado y si debe ser en batch o en modo continuo de operación. La mayoría de las empresas basadas en microalgas se encuentran aquí, Solazyme, Solix, Sapphire Energy, Aurora Biofuels, Origin Oil, Petro Algae, Synthetic Genomics, etc.

#### **1.2.1.4. Biocombustibles de cuarta generación**

La tecnología de cuarta generación combina materias primas (de origen vegetal), optimizadas genéticamente, que están diseñadas para capturar grandes cantidades de carbono, con microbios genómicamente sintetizados, los cuales están hechos para hacer los biocombustibles de una manera más eficiente. A diferencia de las generaciones anteriores, en la cuarta generación la bacteria es la que efectúa la totalidad del proceso de producción de los biocombustibles. La clave es una mayor captura y secuestro de CO<sub>2</sub> de la atmósfera, un proceso que hace que la cuarta generación de biocombustibles sea una fuente negativa de carbono. Esta es una tecnología emergente y se encuentra en fase de investigación. Empresas como Joule Unlimited, LS9, Algenol, Naturally Scientific y Amyris Biotechnologies se pueden encontrar aquí.

#### **1.2.2. Tipos de biocombustibles**

##### **Bioalcohol**

El bioalcohol más producido en el mundo es el bioetanol, el cual es producido mediante el proceso de fermentación a partir del maíz y de la caña de azúcar principalmente (Majer et al. 2009). La producción mundial de bioetanol se triplicó entre el periodo 2000 y 2007, que asciende a 52 mil millones de litros.

Para el 2011, su producción se incrementó un 60% llegando a los 84.6 mil millones de litros; en los Estados Unidos se alcanzaron los 52.6 mil millones de litros de producción de etanol, lo que contribuye el 62.2% de la producción mundial, mientras que Brasil con 21.1 mil millones de litros ocupó el segundo lugar.

El bioetanol se utiliza principalmente en Brasil y en los Estados Unidos; juntos son responsables del 87.1% de la producción mundial de combustibles a base de etanol a partir de 2011. La mayoría de los automóviles en los Estados Unidos funcionan con mezclas de etanol hasta con un 10%. El Gobierno de Brasil ha hecho obligatorio desde 1976 las mezclas de etanol con gasolina; y a partir del 2007, la mezcla legal es E25. A

diciembre del 2011, Brasil tenía 14.8 millones de automóviles y 1.5 millones de motocicletas utilizando solamente etanol puro (E100) como combustible. Aunque los Estados Unidos utilizan el maíz como la principal fuente para producir bioetanol, la compañía General Motors ha iniciado la producción del bioetanol E85 a partir de celulosa, para un posible costo proyectado en \$1 Dólar por galón (Domingos Padula et al. 2014).

## **Biogas**

La producción de biogás a partir de biomasa de microalgas es llevada a cabo por digestión anaeróbica. Sin embargo hasta hace poco tiempo, el biogás era simplemente visto como un subproducto, obtenido a partir de la descomposición anaeróbica del desecho urbano, residuos animales y del lodo proveniente de estaciones de tratamiento de efluentes domésticos. Sin embargo, en los últimos años, delante del gran volumen de residuos provenientes de las exploraciones agrícolas y pecuarias, así como también aquellos producidos por mataderos, destilerías, fábricas de lácteos, tratamientos de alcantarillados domésticos y entierros sanitarios; la conversión energética del biogás se presenta como una solución y un logro ambiental, logrando la disminución de costos, en la medida en que se reduce el potencial tóxico de las emisiones de metano y produciendo energía eléctrica al mismo tiempo.

El proceso de formación del biogás consiste en la descomposición del material por la acción de bacterias (microorganismos acidogénicos y metanogénicos). Se trata de un proceso conocido hace mucho tiempo, que ocurre naturalmente con casi todos los compuestos orgánicos y es usado para la conversión en energía de cocimiento, iluminación y como biofertilizante, siendo muy popular en los países asiáticos como China e India. El mecanismo de descomposición anaeróbica se desarrolla por la acción de un consorcio de microorganismos. El biogás, producto de la degradación anaeróbica, es compuesto mayoritariamente por metano (50%–70%) y CO<sub>2</sub>, el biometano puede ser colectado y utilizado como combustible para la generación de calor o energía (Weiland, 2010)



Los biodigestores son sistemas cerrados de degradación anaeróbica en que los gases producidos son colectados y almacenados en compartimientos llamados gasómetros para una posterior utilización o simple quema. Varios modelos de biodigestores han sido desarrollados y adaptados para buscarse un aumento de la eficiencia de esos sistemas aliados a una reducción de costos de los equipos. Los principales modelos de biodigestores son el hindú, chino y canadiense, siendo este último bastante utilizado recientemente, principalmente por el desarrollo de geomembranas que facilitan su instalación. (Kunz & Oliveira 2006).

Actualmente la producción de biogas se basa principalmente en el uso de lodo del alcantarillado municipal de estaciones de tratamiento de agua y casitodo el biogás producido en el mundo es usado para calentamiento y producción de electricidad. El uso de metano como combustible vehicular es posible y actualmente utilizado en carácter piloto en las flotas de buses urbanos de algunas ciudades de Suecia, Francia, Italia, Suiza e Islandia. Su uso más generalizado para esas aplicaciones dificultado por los siguientes factores: (1) bajo desarrollo de tecnologías para producción, principalmente relacionadas a la calidad del biogas a ser utilizado; (2) sistemas de distribución limitados y bajo número de estaciones de abastecimiento; (3) costos elevados de vehículos mixtos de combustibles en comparación con vehículos que utilizan etanol o biodiesel. Suecia ha puesto grandes esfuerzos en este tema, pero hay un aumento del interés del desarrollo de tecnologías en otros países, incluyendo Alemania, Austria, Francia, España, India, China y EUA (Persson et al. 2006).

## **Biodiesel**

El biodiesel es una mezcla de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de recursos renovables tales como aceites vegetales o grasas animales (international standards organization ASTM 6751-09). Esta definición también es aceptada por las especificaciones de la Unión Europea (Estándar EU 14214). Una característica importante de los biocombustibles como el biodiesel es que puede ser utilizado en su forma pura (B100) o en mezclas con diesel de petróleo que pueden ser del 2% (B2), 5% (B5) y 20% (B20) (Scott et al. 2010; Domingos Padula et al. 2014).

Las propiedades del biodiesel varían de acuerdo a la materia prima, y entre las más sobresalientes y atractivas están su biodegradabilidad y no toxicidad, comparado con el diesel fósil.

La razón principal por la cual los aceites vegetales no se pueden utilizar directamente en los motores diesel es por su alta viscosidad la cual está relacionada a su estructura química. Conforme aumenta la longitud de la cadena carbonada de los lípidos, mayor es la viscosidad. Sin embargo, la viscosidad disminuye cuando aumenta el número de enlaces dobles (grado de insaturación). Existen cuatro procesos químicos que se utilizan para resolver el problema de viscosidad: dilución, microemulsificación, pirólisis y transesterificación, siendo este último el más recomendado y preferido (Canakci y Sanli 2008; Shales 2007). La reacción de transesterificación es la transformación de un triglicérido en un éster alquílico de ácidos grasos, en presencia de un alcohol (metanol o etanol) y un catalizador (un álcali o un ácido), obteniendo glicerol como subproducto. Las moléculas lineales del éster resultante reciben el nombre de biodiesel y están formadas por el éster del ácido graso y el alcohol. La reacción de transesterificación requiere de 3 moles de alcohol por cada mol de triglicéridos para producir 1 mol de glicerol y 3 moles de metil ésteres (biodiesel). El biodiesel obtenido tiene menor viscosidad, menor masa molecular, menor intervalo de ebullición y menor punto de inflamación que el triglicérido original (Canakci y Sanli 2008; Vasudevan y Briggs 2008). En los procesos industriales se usan 6 moles de metanol por cada mol de triglicéridos para asegurar la producción de metil ésteres o biodiesel (Fukuda et al. 2001).

## **Biojetfuel**

En menos de una década, los combustibles alternativos sustentables se han convertido en una solución prometedora para limitar (GEI) gases de efecto invernadero de la aviación. Los Combustibles alternativos se encuentran entre el conjunto de medidas consideradas por los Estados miembros de la ICAO para contribuir en las aspiraciones de lograr la meta mundial de estabilizarla emisión de los gases de efecto invernadero de la aviación

internacional en los niveles de 2020. Así como reducir el consumo de combustible a través de mejoras tecnológicas y operacionales, fundamental para limitar el impacto de la aviación sobre el medio ambiente, las ganancias esperadas en la eficiencia no compensan totalmente el aumento en el consumo de combustible resultante del crecimiento del tráfico aéreo previsto para los próximos 40 años. Los Estados Unidos consumen alrededor de 26 mil millones de galones de combustible para avión (jet fuel) a base de petróleo anualmente (Butnark, 2003). Se considera que la aviación es responsable en alrededor del 9% de las emisiones de efecto invernadero del transporte en los Estados Unidos (Fortenbery, 2004)

Cuando se producen combustibles alternativos a partir de fuentes renovables o de residuos, tienen el potencial de traer reducciones sustanciales de las emisiones de los GEI en una base de ciclo de vida, y por lo tanto pueden cerrar parte de esta brecha. Teniendo en cuenta los beneficios potenciales del uso de combustibles alternativos sustentables en la aviación y el esfuerzo sostenido requerido para su desarrollo, la ICAO convocó a la Conferencia sobre la aviación y los combustibles alternativos en Río de Janeiro en noviembre de 2009 invitando a los Estados a seguir trabajando juntos a través de la ICAO para compartir sus esfuerzos y las estrategias para acelerar el desarrollo y despliegue de los combustibles alternativos para la aviación.

El sector de los combustibles alternativos para avión (jet fuel), se ha mantenido muy activo en los últimos años con las nuevas iniciativas puestas en marcha para su promoción y desarrollo, y con un número creciente de países que expresan su interés. Las Aerolíneas y los principales fabricantes de aviones han estado fuertemente implicados en estas iniciativas, con el objetivo de asegurar el suministro de combustibles de aviación sustentables a futuro. Los desarrollos tecnológicos también están aumentando con un impresionante número de empresas de tecnología trabajando y desarrollando o proponiendo numerosos procesos para su aprobación (IATA, International Air Transport Association 2013), (ICAO, International Civil Aviation Organization 2013).

Un paso importante para los combustibles alternativos sustentables para la aviación fue la aprobación en 2009 de los primeros combustibles "drop-in", es decir, los combustibles

que son totalmente compatibles con los sistemas existentes y que se puede utilizar como si fueran combustible convencional sin limitaciones en aeronaves operaciones. El esfuerzo por desarrollar combustibles alternativos con moléculas y propiedades similares al convencional Jet fuel A-1 garantiza el cumplimiento de los estrictos requerimientos de la aviación sobre las propiedades del combustible. Como resultado, se preservó la seguridad de las operaciones, y cualquier impacto en los costos que pueden haber sido incurridos debido a un cambio en la infraestructura, se evitó.

Después de la primera aprobación del combustible Fischer-Tropsch en 2009, la aprobación de hidroprocesados de ésteres y ácidos grasos (HEFA) por la ASTM (American Society of Testing and Materials) en 2011 abrió la puerta a la primera utilización comercial de los combustibles alternativos sustentables en la aviación. El número de vuelos comerciales utilizando combustible HEFA se ha multiplicado y, a partir de junio de 2012, más de 18 compañías aéreas habían realizado colectivamente más de 1.500 vuelos comerciales, incluyendo vuelos regulares.

El aumento de los vuelos comerciales que utilizan combustibles alternativos demostró la viabilidad técnica de estos combustibles en la aviación, y un fuerte interés de las compañías aéreas. Sin embargo, la producción de estos combustibles se encuentra todavía en su fase temprana con un volumen limitado actualmente disponible. Todavía hay retos importantes que superar antes de que estos combustibles puedan representar una parte apreciable de la oferta mundial de combustible de jet, (IATA, International Air Transport Association 2013).

Hay varios procesos para convertir los aceites vegetales (jatropha, coco, soya, canola, etc.) en biojet fuel. La mejor desarrollada y probada hasta la fecha se llama 'hidroprocesado' que consiste en añadir hidrógeno para eliminar el oxígeno de la materia prima y transformar estos ácidos grasos en alcanos y después refinar aún más el producto restante para cumplir con las especificaciones (C9 a C16) de los biojet fuels. Liderando el camino con esta tecnología está la empresa UOP (Universal Oil Products) filial de la compañía Honeywell.

Una ventaja importante de los biojet fuels, es que ofrecen una menor emisión de contaminantes en aviones comerciales y militares, además de que pueden sustituir o se pueden mezclar con el combustible tradicional (Tabla 1), lo que significa que el combustible para aviones tradicional es químicamente semejante. Como resultado de ello, son totalmente compatibles a los sistemas de distribución y con los motores existentes; sin modificaciones necesarias y cumpliendo los mismos criterios de rendimiento como los combustibles tradicionales.

**Tabla 1.** Tipos de combustible de aviación Comercial y Militar (Günther 2008).

<b>Combustible Civil/Comercial</b>	<b>Combustible Militar</b>
<b>Jet A-1:</b> Grado queroseno adecuado para la mayoría de aviones de motor de turbina. Punto de inflamación por encima de 38°C (100 °F). Punto máximo de congelación (-47 °C). Calor de combustión del mínimo (42.8MJ /kg)	<b>JP-4:</b> El equivalente militar del Jet B con la adición de aditivos inhibidores de corrosión y anticongelante.
<b>JET A:</b> Combustible de tipo queroseno. Punto de inflamación por encima de 38°C (100 °F) Punto de congelación máximo (-40 °C)	<b>JP-5:</b> Queroseno de alto punto de inflamación.
<b>JET B:</b> Destilado con fracciones de nafta y queroseno. Punto máximo de congelación (-50 °C). Calor de combustión mínimo (42.8MJ /kg). Altamente flamable. Demanda significativa en climas muy fríos.	<b>JP-8:</b> El equivalente militar de Jet A-1 con la adición de aditivos inhibidores de corrosión y anticongelante.

### 1.2.3. Microalgas definición

Las microalgas son consideradas los organismos más antiguos de la Tierra, habiendo evidencias de su existencia ya en el precámbrico, hace aproximadamente 3,5 billones de años. Posiblemente fueron las responsables por la producción y por la acumulación de O<sub>2</sub> en la atmósfera primitiva, desempeñando, hasta hoy, un rol importante en el mantenimiento de los niveles de ese gas. Al igual que las plantas, las algas requieren principalmente tres componentes para producir biomasa, luz solar, CO<sub>2</sub> y agua; pueden ser de agua dulce o marina, algunas crecen óptimamente a niveles salinos intermedios y algunas otras en condiciones hipersalinas, así mismo a diferentes temperaturas y condiciones de pH. De hecho, las microalgas son reconocidas por presentar eficiencia fotosintética superior a las plantas, tasas de proliferación rápida, gran variedad de

tolerancia a ambientes extremos, además de presentar excelente adaptabilidad a cultivos intensivos, lo que las hace eficaces en la reducción del CO<sub>2</sub> atmosférico (Kurano et al. 1995).

Pueden ser procarióticas o eucarióticas, móviles o no móviles dependiendo de la presencia de flagelos, son unicelulares y se pueden encontrar como células solitarias o en grupos de células individuales conectadas entre sí, presentando similitud en muchos aspectos comunes con las plantas superiores, por ejemplo, la existencia de clorofila como pigmento fotosintético primario (Sing et al. 2011; Van den Hoek et al. 1989).

Presentan una amplia distribución geográfica, pudiendo ser encontradas en prácticamente todas las condiciones ambientales de la Tierra, como en los sistemas acuáticos y marinos típicamente, pero también se encuentran en el suelo (desde fértiles a desiertos), el hielo o en el agua volcánica que pueden tener fluctuaciones ambientales extremas (Van Thang et al. 2015). Sin embargo, son en los ambientes acuáticos que se encuentra mayor prevalencia de las microalgas. El número exacto de especies es desconocido y son encontradas citas relatando valores entre 200.000 hasta algunos millones de representantes de ese grupo. Tal diversidad también se refleja en la composición bioquímica y, de esa forma, las microalgas son una fuente potencial de gran cantidad de productos (Pulz & Gross 2004). Varias especies son cultivadas comercialmente y la biomasa producida ha sido utilizada como fuente de diversos productos de alto valor agregado (Tabla 2). Así mismo las microalgas contienen altos niveles de varios lípidos y para algunas especies en ciertas situaciones, se ha citado hasta el 80% de aceite de su peso (Singh et al. 2010); utilizando estos lípidos (triglicéridos) como moléculas de almacenamiento de energía, los cuales pueden ser fácilmente transformados a biodiesel mediante un proceso de transesterificación.

Tabla 2 Especies cultivadas comercialmente como fuente de diversos productos de alto valor agregado

Especie	Producción Ton/peso seco/año	Países productores	Aplicación	Precio (US \$)
<i>Spirulina</i>	3000	China, India, EUA, Francia, Japon	Nutrición humana y cosméticos	44/kg
<i>Chlorella</i>	2000	Japón, Alemania, Canada	Nutrición humana, cosméticos, acuicultura	44/kg 61/L
<i>Dunaliella</i>	1200	Australia, EUA, Israel, China Japón	Nutrición humana, Cosméticos, beta Caroteno	260 - 3600/kg
<i>H. pluvialis</i>	300	EUA, India, Israel	Acuicultura, Astaxantina	610 – 8700/kg
<i>C. cohnii</i>	240 ton. aceite	EUA	DHA (Omega 3)	52/gr
<i>Shizochytrium</i>	10 ton aceite	EUA	DHA	52/gr

Spolaore et al. 2006

El interés por el aceite de microalgas, como sustituto del petróleo, comenzó en 1970. En respuesta al embargo petrolero impuesto a los Estados Unidos por los países árabes en represalia por su apoyo a Israel durante la Cuarta Guerra árabe-israelí. En ese momento, la tecnología para convertir los lípidos en diesel, ya estaba bien establecida, mediante un proceso químico conocido como esterificación. Así que el reto se convirtió en determinar qué organismos se utilizarían para la producción de biodiesel y cómo hacerlos crecer a una escala industrial (Benemann et al. 1977). En respuesta a este desafío, un nuevo e importante programa, llamado Programa de Especies Acuáticas (ASP), fue establecido en 1978 por el Departamento de Energía de Estados Unidos. Pruebas piloto fueron llevadas a cabo en Hawai, en el sur de California y Nuevo México. Desafortunadamente, el Programa ASP se terminó en 1996 debido a los recortes presupuestarios (Sheehan et al. 1998). El Biodiesel a partir de microalgas nuevamente captó la atención en 2007, cuando el Congreso de los Estados Unidos aprobó una ley llamada Ley de Independencia y Seguridad Energética (EISA). La ley establece que el 20% del consumo de gasolina debe ser reemplazado por biocombustibles renovables para el año 2017.

En general, la biomasa de microalgas contiene 20 a 30% de carbohidratos, 10-20% de lípidos, y un 40-60% de proteínas (Sing et al. 2011). En muchos casos, los

investigadores han sido capaces de manipular estos niveles para favorecer un producto final en particular. Por ejemplo, si el nitrógeno está restringido (Chisti 2007), o incrementado (Feng et al. 2011), las microalgas tienden a producir más lípidos que carbohidratos. Debido a estas propiedades, a la alta tasa de crecimiento, flexibilidad en la ubicación de instalaciones y al alto contenido de lípidos, con un potencial de producir 100 veces más aceite por acre de tierra, que cualquier planta terrestre (Sing et al. 2011); las microalgas han sido consideradas uno de los principales candidatos para minimizar nuestra necesidad por los combustibles fósiles (Amaro et al. 2011; Chisti 2007; Dismukes et al. 2008; Hu et al. 2008; Li et al. 2008; Pienkos y Darzins 2009; Williams y Laurens 2010).

### **1.2.3.1. Ventajas de las microalgas**

La ventaja de usar microalgas se deriva de sus propiedades biológicas únicas; sólo requieren energía solar, agua, CO<sub>2</sub> y algunas sales para producir muy altos rendimientos de biomasa rica en lípidos (Li et al. 2008a), son más eficientes que las plantas terrestres en la conversión de luz solar en energía bioquímica (Stephenson et al. 2011), pueden cultivarse en cualquier lugar que reciba la luz solar, incluyendo zonas con calidad de suelos muy pobres (desiertos). En comparación con los aceites de origen vegetal, el aceite de microalgas tiene relativamente un alto contenido de carbono e hidrógeno y un bajo contenido de oxígeno generando un combustible con alto contenido de energía, baja viscosidad, y baja densidad. En la mayoría de los casos, el biodiesel se puede quemar directamente en un motor diesel estándar sin emisión de la mezcla con el diesel normal (Gong y Jiang 2011). Otras ventajas son:

- ✓ Aunque crezcan en medio acuoso, el gasto de agua es menor comparado al cultivo de plantas terrestres.
- ✓ El CO<sub>2</sub> necesario para su producción puede ser de efluentes industriales.
- ✓ Su cultivo no requiere aplicación de herbicidas o pesticidas.
- ✓ Los nutrientes necesarios para su cultivo (especialmente nitrógeno y fósforo) pueden ser obtenidos de efluentes líquidos industriales.



- ✓ No hay régimen de cosecha, es decir, hay producción durante todo el año, lo que lleva a un potencial de producción por área al año mucho más alto que el de cultivos convencionales.
- ✓ Alto grado de aceite, que puede llegar al 80% de su peso.
- ✓ Crecimiento rápido – algunas especies llegan a doblar su biomasa en 3.5h en la fase de crecimiento exponencial (Chisti 2007).
- ✓ Por ser organismos simples, su composición puede ser modificada por las condiciones de cultivo.
- ✓ Las microalgas tienen un rendimiento de aceite mucho mayor que cualquier cultivo convencional. Es de 10 a 20 veces mayor que el derivado del aceite de palma y de 200 a 400 veces mayor que el derivado del aceite de soya.
- ✓ Con biodiesel de microalgas cultivadas en lagunas abiertas (LA), sólo se requieren 200,000 has para producir 1 cuadrillón de BTU (Sheehan et al. 1998). En contraste, se requieren aproximadamente 40 millones de has si se utiliza etanol derivado de maíz o 20 millones de has si se utiliza biodiesel derivado de frijol de soya.
- ✓ Las microalgas oleaginosas pueden ser cultivadas en agua de mar o en agua salobre, disminuyendo así la presión sobre el agua dulce requerida para la producción de alimento. Algunas otras especies aisladas de agua dulce, pueden crecer en aguas residuales, también eliminando la competencia por el uso de agua para la agricultura.
- ✓ Las microalgas son excelentes captadoras de CO<sub>2</sub>. Por cada 100 ton de microalgas producidas, se consumen 183 ton de CO<sub>2</sub> (Chisti, 2007).
- ✓ Con relación a la emisión de gases invernadero, es de los pocos bionergéticos con un valor negativo. Es decir, no se produce CO<sub>2</sub> durante el ciclo de vida de producción y el valor de este parámetro para microalgas (-183 kgCO<sub>2</sub>MJ) es el más negativo respecto a los otros bionergéticos con valores negativos (etanol a partir de pastos o de residuos celulósicos). En contraste, el diesel a partir de fuentes fósiles produce 83 kgCO<sub>2</sub>MJ y el etanol a partir de maíz produce 81-85 kgCO<sub>2</sub>MJ (Chisti 2007).

Sólo este bioenergético tiene una verdadera huella ecológica pequeña, dado que requiere una superficie de 1-2 órdenes de magnitud menores en comparación a los cultivos convencionales o los árboles. Requiere de 1.5 a 3.2 millones de hectáreas (M has) para satisfacer el 50% de las demandas de energéticos de transportación en U.S.A. (Chisti 2007). En contraste, la soya, principal fuente de biodiesel en U.S.A. requiere de 330 a 450 M has para un propósito similar. En México, se ha estimado que sólo se requiere el 1% de la superficie total del país, para cubrir el 100% de la demanda actual de diesel de petróleo (Garibay et al. 2009). Además del potencial de las microalgas como materia prima del biodiesel, también se emplea en diversas aplicaciones en otro tipo de biocombustibles, como en la producción de gasolina y jet fuel (queroseno) (Lestari et al. 2009), etanol a través de la fermentación (Wangetal 2011; Matsumoto et al. 2003; Ho et al. 2013), la producción de metano (biogás) por la digestión anaeróbica (Carver et al. 2011; Lakaniemi et al. 2011; Zamalloa et al. 2011; Markou et al. 2013) y producción de bio-petróleo crudo y syngas ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{CH}_4$   $\text{H}_2$ ) a través de diferentes métodos de procesamiento termoquímicos (Yang et al. 2004). Inclusive se pueden utilizar como una valiosa materia prima en fertilizantes, nutracéuticos, en la alimentación acuícola o del ganado (Mulbry et al. 2008), para la bio-fijación de  $\text{CO}_2$ , en el tratamiento de aguas de desecho (Craggs et al. 2011), en la producción de biopolímeros, gasavión (aviation gasoline), proteínas recombinantes, pigmentos, medicinas y vacunas (Pulz 2004; Pienkos y Darzins 2009).

### **1.2.3.2. Desventajas de las Microalgas**

Si bien no hay duda de que la producción de biomasa de las microalgas tiene el potencial de generar energía limpia para el mundo, todavía hay algunas desventajas graves que la ciencia necesita encontrar soluciones antes de que la industria de los biocombustibles a base de microalgas se vuelva comercial.

la productividad de la biomasa microalgal, el contenido celular de lípidos y sobre todo, la productividad de lípidos, son parámetros claves que afectan la factibilidad económica de la producción de biodiesel a partir de microalgas. La productividad de lípidos determina el costo del proceso de cultivo, mientras que la concentración de la biomasa

en el cultivo y el contenido celular de los lípidos, afectan significativamente el costo de los procesos de extracción y transformación. Por lo tanto, un proceso ideal debería permitir la producción de lípidos a la más alta productividad celular, con el contenido más alto posible en las células (Li et al. 2008b). Desafortunadamente esta situación ideal es muy difícil de encontrar en la práctica, dado que las células con alto contenido de lípidos son producidas bajo condiciones de estrés fisiológico, el cual está asociado a condiciones limitantes de nutrientes y por lo tanto, de baja productividad de biomasa y de lípidos.

los costos operativos y de capital hacen que la producción de aceite de algas sea demasiado caro para ser económicamente aceptable. Se necesitan mucho más recursos e investigación para convertir este gran potencial en una producción comercialmente viable

Por lo anterior, los mayores retos en el desarrollo de procesos para la producción de biodeiesel con microalgas consisten en:

- a) Seleccionar las mejores cepas, en términos de máximo contenido de lípidos y máxima productividad, mejor perfil de lípidos y adaptabilidad al tipo de agua a utilizar y a las condiciones ambientales.
- b) Establecer estrategias de cultivo adecuadas que permitan lograr la máxima productividad de lípidos y de biomasa.
- c) Lograr el uso de aguas residuales, evitando contaminaciones.
- d) Seleccionar el tipo de reactor más adecuado o una combinación de ellos, para máxima producción de biomasa al mínimo costo.
- e) Lograr abatir los costos de cosecha.
- f) Lograr una extracción de lípidos y su conversión a biodiesel, mediante estrategias de mínimo costo (Loera-Quezada y Olguín 2010).

Sin embargo a pesar de que existan esos obstáculos, diversas empresas han sido creadas o entraron en ese nicho de mercado, ya sea en el mejoramiento de microalgas, desarrollo de reactores, sistemas de extracción o del proceso de producción como un todo.

### **1.2.3.3. Colecta de microalgas**

El primer paso para establecer un cultivo de microalgas con potencial para producción de biocombustibles es la colecta de las mismas; ya que las condiciones para definir los sitios de colecta no son restrictivas, se pueden obtener numerosas muestras para hacer observaciones de morfología y así facilitar su aislamiento de hábitats de agua dulce, salobre y de los ecosistemas marinos. Cada micro-ambiente puede proporcionar cepas de algas con propiedades muy diferentes; en contraste con la manipulación de sólo unas pocas cepas de algas cultivadas individuales en el laboratorio para alta productividad de lípidos, una estrategia más eficiente y útil para identificar microalgas oleaginosas sería una investigación en profundidad y sistemática de un grupo taxonómico conjunto de microalgas en una amplia distribución geográfica y ecológica (Rismani et al. 2011).

### **1.2.3.4. Aislamiento de microalgas**

El aislamiento es un proceso necesario para obtener cultivos puros y presenta el primer paso hacia la selección de cepas de microalgas con potencial para la producción de biodiesel (Van Thang et al. 2012). Aunque muchas especies han sido identificadas y aisladas para la producción de lípidos, actualmente no existe un consenso en cuanto a las especies que proporcionan la más alta productividad. Se espera que diferentes especies tengan mejor desempeño en diferentes condiciones acuáticas, geográficas y climáticas (Van Thang et al. 2012)

### **1.2.3.5. Cultivo de microalgas**

De modo general, las microalgas pueden asumir diferentes metabolismos, y el sistema de cultivo será diferente para cada uno de ellos:

**Cultivo autotrófico (o foto-autotrófico)** –empleo de la luz como exclusiva fuente energética y CO<sub>2</sub> como fuente de carbono. Las microalgas realizan la fotosíntesis para la obtención de energía de la luz, para la fijación del CO<sub>2</sub> liberación de O<sub>2</sub> es el único sistema utilizado comercialmente en los días actuales).

**Cultivo heterotrófico** –empleo exclusivo de compuestos orgánicos, sin la utilización de luz (no hay realización de fotosíntesis). El carbono orgánico sirve tanto como fuente energética como para construcción de la biomasa.

**Cultivo mixotrófico** –utilización simultánea de una fuente luminosa y substrato orgánico como fuente de energía, así como también del CO<sub>2</sub> substrato orgánico como fuente de carbono. La fotosíntesis es la principal fuente energética, aunque el carbono orgánico y el CO<sub>2</sub> ambién sean esenciales. Así, estas microalgas podrán ser cultivadas en los mismos sistemas que para el cultivo autotrófico, siempre que sean adicionados los nutrientes esenciales al medio. Por no ser tan dependientes de la luz, normalmente las microalgas con éste metabolismo alcanzan rendimientos más altos.

#### **1.2.4. Producción de microalgas**

En la década de 1950 se postuló por primera vez que el empleo de luz solar y agua marina, para obtener cultivos masivos de microalgas ricas en proteína de alta calidad, podría ser una buena alternativa para obtener alimento para el ser humano (Becker, 1994). Durante los años 60 y 70, diversos grupos de investigación tanto de países desarrollados como en vías de desarrollo, dedicaron esfuerzos a intentar lograr rendimientos de biomasa que pudieran equipararse a los obtenidos con microorganismos no autótrofos (principalmente levaduras). En el transcurso de los años se pudieron diversificar las áreas donde las microalgas eucariotas (Vilchez et al. 1997) y cianobacterias (Morales et al. 2002; Prospero 2000) cultivadas masivamente tienen aplicaciones prometedoras, especialmente en la producción de compuestos químicos "finos," en los biocombustibles, en el tratamiento de aguas residuales, como intercambiadores iónicos, como biofertilizantes, para la obtención de compuestos terapéuticos o aplicados a la terapéutica y como alimento de consumo humano o animal. Sin embargo, la productividad teórica estimada de 100 toneladas anuales por hectárea de cultivos microalgales (Richmond 2000), no pudo ser alcanzada ni siquiera en los laboratorios de investigación, sino hasta principios de la década de los 90. Una limitante para lograr los estimados teóricos se debió a que el sistema raceway pond, que inicialmente fue el mejor sistema para desarrollar cultivos en masa por su facilidad de

construcción y operación, paradójicamente resultó inapropiado como punto de partida para el desarrollo de sistemas de cultivo de alta productividad (Richmond 2000). El cultivo intensivo de microalgas ha sido posible en gran medida gracias al desarrollo de nuevos diseños de fotobiorreactores.

El éxito de la producción de biomasa y compuestos químicos por las microalgas dependen de gran forma del diseño de los fotobiorreactores. Existen dos diseños básicos para la producción de microorganismos fotoautotróficos (Grobbelaar 2000), los sistemas abiertos conocidos como raceways ponds o Lagunas Abiertas y los sistemas cerrados, comúnmente denominados fotobiorreactores, en los que el cultivo tiene poco o ningún contacto con la atmósfera.

#### **1.2.4.1. Sistemas abiertos**

La mayoría de los sistemas de producción industrial de biomasa de microalgas construidos antes de los años 90 fueron esencialmente sistemas abiertos; este sistema de cultivo de algas es técnicamente y económicamente viable en gran escala. Los sistemas de cultivo comerciales existentes poseen actualmente un tamaño que varía de 100 L (para producción de compuestos orgánicos) a 10.000.000 m<sup>3</sup> que aunque presenten diferentes formatos y tamaños diversos se destacan por tener similitud con el ambiente natural de las microalgas. Los tanques son generalmente rasos, construidos en concreto, fibra de vidrio, policarbonato, con fondo de tierra o revestidos con material plástico, pudiendo ser agitados o no. Los principales tipos existentes son grandes lagunas abiertas (“open ponds”), lagunas circulares (“circular ponds”) con brazo rotatorio y lagunas en circuito de alto flujo (“raceway ponds”). Estos últimos, constituidos por canales poco profundos (nivel de agua de 15-20cm) en forma de circuito cerrado, en los que el medio de cultivo es impulsado mediante paletas rotatorias, permiten alcanzar densidades celulares de hasta 0,7g de células (base seca) por litro.

#### **1.2.4.2. Ventajas de Sistemas abiertos**

Las dos principales ventajas de estos sistemas son la baja inversión y el uso de la energía solar (Brennan y Owende 2010).

#### **1.2.4.3. Desventajas de Sistemas abiertos**

Generalmente requieren de grandes áreas de terreno (500-5000m<sup>2</sup>), presentan problemas de contaminación por otras algas o microorganismos, tienen menor productividad (comparados a los sistemas cerrados), normalmente debido a pérdidas por evaporación, variación de temperatura, agitación ineficiente y limitación de luz (Brennan y Owende 2010). Además de que el perfeccionamiento de esta tecnología hace tiempo llegó a su límite, restringiendo así el desarrollo de la biotecnología de microalgas.

#### **1.2.4.4. Sistemas cerrados o Fotobiorreactores (FBRs)**

Los inconvenientes de los sistemas abiertos estimularon el desarrollo de los fotobiorreactores. Un fotobiorreactor es un dispositivo técnico cerrado diseñado para producir microorganismos fotosintéticos en colaboración con los requerimientos óptimos de luz, mezclado, temperatura y nutrientes (Pulz 2001). Construidos con materiales transparentes como vidrio y policarbonato, entre otros materiales. Los primeros fotobiorreactores fueron propuestos por Pirt et al. (1983), Gudín y Chaumont (1983), y Torzillo et al. (1986). Actualmente pueden ser panel y plato delgado (Fig.1), tanque agitado o tubular horizontal (Fig.2), tubular helicoidal, tipo Air lift (Fig.3), o de columna de burbujas (Fig.4). En la última década los fotobiorreactores tubulares y de placas planas han recibido, entre otros, mucha atención, ya que permiten establecer cultivos de alta densidad celular, 3 o más veces en comparación con los sistemas convencionales de raceway ponds. La mayoría de los FBRs expuestos a condiciones ambientales exteriores se caracterizan por tener grandes áreas de iluminación y desde este punto de vista, los tipo placa plana y los tubulares horizontales inclinados son los mejores, excepto por la dificultad de escalamiento, mientras que los de columna de burbujeo, los airlifty el tipo tanque agitado son de fácil escalamiento, pero tienen áreas de iluminación menores respecto al resto de los FBRs (Ugwu *et al.*, 2008).



Fig.1 Fotobiorreactores planos: panel delgado izquierda, plato delgado derecha (Carvalho et al. 2006).



Fig. 2 fotobiorreactores tanque agitado izquierda, tubular horizontal derecha (Carvalho et al. 2006).

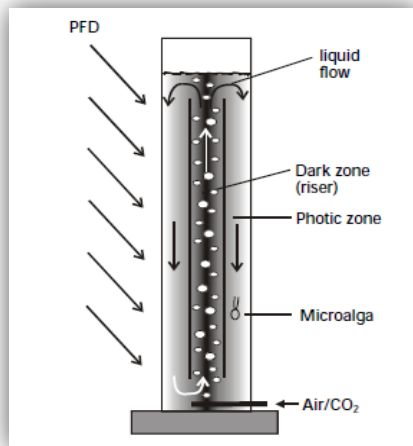


Figura 3



Figura 4

Fig. 3 y 4. Fotobiorreactor de tipo Air lift (fig.3) y de columna de burbujas inclinado (Fig. 4) (Carvalho et al. 2006).



#### **1.2.4.5. Ventajas de Sistemas cerrados o Fotobiorreactores (FBRs)**

Los FBR cerrados presentan mayores ventajas que los sistemas abiertos siendo el control de las condiciones de cultivo la de mayor importancia (cantidades de los nutrientes, temperatura, iluminación, pH, etc.) lo que implica una elevada productividad y calidad de biomasa generada, viabilizando la producción comercial de una serie de compuestos de elevado valor (Beneman 2009). Además de una mayor facilidad para cosechar la biomasa, no está limitado a las condiciones climáticas, se reduce el riesgo de contaminación y mejora la reproducibilidad de las condiciones de cultivo, asimismo permitir un diseño técnico apropiado (Singh y Sharma 2012). Tienen menor pérdida de agua, el espacio requerido es menor y el inicio de cada producción es de 2 – 4 semanas.

#### **1.2.4.6. Desventajas de Sistemas cerrados o Fotobiorreactores (FBRs)**

Sin embargo, esos sistemas son mucho más caros comparados con los sistemas abiertos, y presentan ciertos desafíos operacionales que deben ser superados (incrustaciones, supercalentamiento, limitación de cambio gaseoso, dificultad para su escalamiento (Beneman 2009), deterioro de materiales, deterioro de equipo por corrosión biológica, acumulación de oxígeno y daño celular por turbulencia.

#### **1.2.4.7. Fotobiorreactor Air lift**

La Biotecnología de algas ha progresado de forma relativamente lenta, a pesar de su reconocida utilidad como una fuente potencial de compuestos de alto valor para la industria farmacéutica y de alimentos (Apt y Behrens 1999). Un factor limitante es la falta de técnicas eficientes de cultivo a gran escala. Varias de las aplicaciones de microalgas exigen el uso de monocultivos y sistemas de cultivo controladas. Este requisito ha llevado a un mayor énfasis en el desarrollo de fotobiorreactores cerrados. Muchos de los problemas de ingeniería todavía necesitan ser resueltos con el fin de desarrollar sistemas de producción rentables. Uno de los principales parámetros en los que deben centrarse los esfuerzos en materia de biotecnología de microalgas es la utilización eficiente de altas intensidades de luz, con el objetivo de aumentar el

rendimiento de la biomasa. En cultivos densos de microalgas la intensidad de la luz disminuye con la distancia desde la superficie irradiada debido al auto-sombreado y a la absorción de la luz, dependiendo de la frecuencia de mezcla, las microalgas están expuestas a ciertos ciclos de luz/oscuridad ( $t_c$ ), y esto es comúnmente encontrado en los fotobiorreactores; por lo tanto los cultivos de células, reciben la luz intermitente, que es el modo más práctico para diluir la luz fuerte y podría dar lugar a un uso más eficaz de la luz por el cultivo (Richmond 2000). La Intermitencia de la luz está asociada con dos parámetros básicos: primero, la fracción de luz, es decir, la relación entre el período de luz y el ciclo de tiempo ( $\epsilon$ ) y segundo, la longitud del ciclo luz /oscuridad. En fotobiorreactores, el diseño del reactor, la longitud de la trayectoria de luz, la concentración celular, el grado de turbulencia del cultivo y la intensidad de luz, determinará la frecuencia y la fracción de luz en los ciclos. Se sabe que el grado de mezclado afecta significativamente la productividad del reactor y el rendimiento de la biomasa sobre la energía lumínica debido a los ciclos resultantes de luz /oscuridad (Hu y Richmond 1996; Hu et al. 1996). Se ha reportado que Luz fluctuante de alta frecuencia ( $t_c \leq 100 \text{seg.}$ ) conduce a mayores tasas de crecimiento y mayores tasas de fotosíntesis que con luz continua (Kok 1953; Matthijs et al. 1996; Nedbal et al. 1996).

Debido a que un buen mezclado puede aumentar la productividad hasta 40% en un fotobiorreactor tubular (Ugwu et al. 2002), una buena opción sería el sistema de mezcla de gases como el empleado en el sistema Air lift, ya que causa menos impacto que los de sistemas de bomba mecánica, que pueden causar daños a la biomasa (Sánchez et al. 2003., Chisti 1999., Mazzuca et al. 2006). Mientras que en el sistema Air lift, la mezcla se alcanza por flujo de fluidos por burbujeo de aire dentro de un tubo central de subida (zona oscura), que luego se distribuye bajando por la parte exterior del tubo central (zona fótica), creando una circulación natural (fig. 5) (Chisti y Jauregui-Haza 2002). En consecuencia, el tiempo empleado por las microalgas en la zona fótica y oscura es determinada por el tiempo de circulación del líquido (10-100 s), que depende de la velocidad del gas y del diseño del reactor (Chisti 1989).

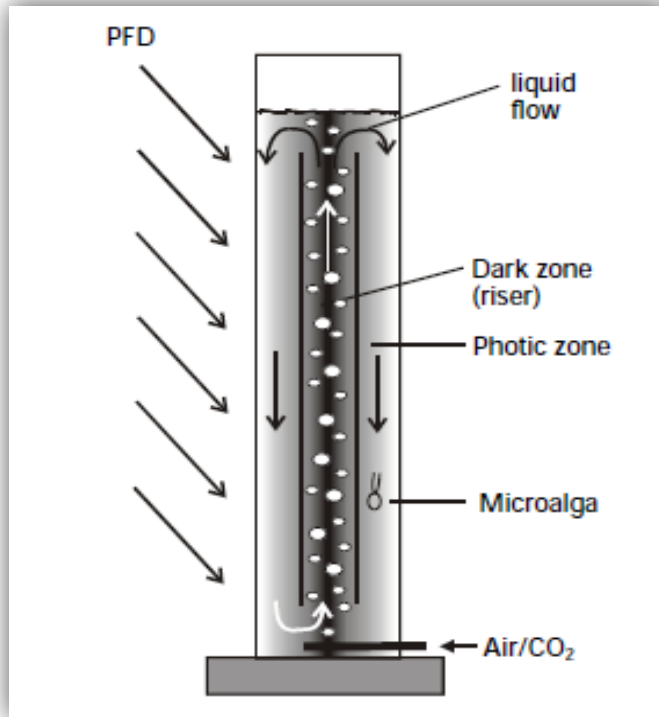


Figura 5. Fotobiorreactor air-lift: régimen de ciclos luz / oscuridad. Densidad de flujo de fotones (PFD).

### 1.2.5. Condiciones de crecimiento

Después de la selección de la microalga con alta producción lipídica, el sitio para cultivo, la técnica de cosecha y el procedimiento de extracción de aceite (Van Thang et al. 2012), se deben redirigir los flujos metabólicos a la acumulación de lípidos, estableciendo condiciones de estrés fisiológico como privación de nutrientes, cambio de temperatura, aumento de la salinidad (Chisti 2013) e intensidad de iluminación (Cornet y Dussap 2009; Chen et al. 2011; Takache et al. 2012). Además de que existen diversas variables que afectan el crecimiento y la acumulación de metabolitos en las microalgas. Es importante determinar las condiciones óptimas de crecimiento, debido a que se conoce que la tasa de rendimiento (biomasa) para un mismo género de microalga puede ser diferente de acuerdo a su lugar de origen (Andersen 2005). En general, la productividad y el contenido de lípidos están inversamente correlacionados, y las condiciones de estrés limitan el crecimiento celular, pero también aumentan el contenido de lípidos. Por ejemplo, mientras que el contenido de lípidos en la microalga *Chlorella*

*vulgaris* cultivada bajo condiciones suficientes de nutrientes está entre 14% y 30% de su peso seco, valores de hasta 70% de la biomasa seca se han reportado en virtud de una deficiencia de nutrientes. El principal fundamento es que, donde hay una insuficiente cantidad de N<sub>2</sub>, para la producción de proteínas necesarias para el crecimiento, el exceso de carbono producido durante la fotosíntesis se canaliza en moléculas de almacenamiento, tales como triacilglicéridos o almidón, y el contenido de proteína puede ser reducido (Scott et al. 2010). Las condiciones óptimas de cultivo dependen de la especie de microalga, cepa, de los medios de crecimiento, y la geometría del fotobiorreactor (Sukeník et al. 1991; Acien Fernández et al. 1997; Barbosa et al. 2003; Williams and Laurens. 2010). Siendo éstas condiciones únicas para cada sistema de cultivo, y sólo obtenidas experimentalmente pueden ser confiables (R. Kandilian et al. 2014).

A continuación se presentan los distintos factores que afectan mayormente los cultivos de microalgas y sus efectos e interacciones en estos microorganismos en general:

#### **1.2.5.1 Determinación de temperatura**

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que afectan el crecimiento y desarrollo de los organismos vivos. El crecimiento de algas depende también de la temperatura, por lo que se requiere conocer un valor óptimo para una tasa máxima de crecimiento. Los sistemas fotosintéticos siempre generan calor a causa de la ineficiencia de la fotosíntesis de convertir la energía luminosa a energía química (Bhosale 2004). La conversión teórica de la luz roja en energía química es de un 31 % y el 69 % restante se pierde como calor. Por ello, la cantidad de enfriamiento en un sistema de cultivo dependerá de la intensidad de la luz y de la concentración celular, sin embargo, el enfriamiento del reactor es sólo utilizado en sistemas cerrados (Andersen 2005).

La temperatura también es importante para la disociación de las moléculas de carbono, haciéndolo disponible para la fotosíntesis (Kommareddy y Anderson 2003). La

temperatura influye en la respiración y fotorespiración de manera más marcada que en la fotosíntesis. Sin embargo, si el CO<sub>2</sub> o la luz es un factor limitante para la fotosíntesis, la influencia de la temperatura resulta insignificante (Pulz 2001). La temperatura óptima para el cultivo de microalgas se encuentra generalmente entre los 20 y 24°C, no obstante, estas pueden variar dependiendo del medio de cultivo, la especie y la cepa utilizada. Comúnmente, los cultivos de microalgas toleran temperaturas de entre 16 y 27 °C, en donde a temperaturas menores a 16°C disminuyen el crecimiento, mientras que una temperatura mayor a los 35°C resulta ser letal para un gran número de especies (Mehlitz 2009)

Los cambios en la temperatura también pueden causar alteraciones en muchas de las rutas metabólicas, incluyendo la biosíntesis de los carotenoides. Se han observado cambios en las características de *Chlorella zofingiensis* cuando se incrementó la temperatura, dando lugar a cambios en la eficiencia de absorción asociada a una variación en el tamaño celular y los niveles de pigmento (Martin 2010). De acuerdo a Del Campo et al. (2004), la acumulación celular de luteína y astaxantina en *Muriellopsis sp.* aumenta cuando es crecida a una temperatura mayor a 33°C, sin embargo el nivel volumétrico se incrementó hasta seis veces más cuando la temperatura fue de 28 °C. A mayores temperaturas de crecimiento, la división celular se altera pero no la síntesis de proteínas. También se ha demostrado que algunas algas aumentan la acumulación de carotenoides a una temperatura de 40 °C en comparación con la tasa obtenida a la temperatura óptima de crecimiento de 28 °C (Mosqueda-Cano y Gutiérrez-Corona 1995), asimismo se ha observado en muchas algas y cianobacterias que la insaturación de los ácidos grasos se incrementa cuando desciende la temperatura y viceversa, cuando la temperatura aumenta, aumenta la saturación de los ácidos grasos (Loera-Quezada y Olguín 2010).

#### **1.2.5.2 Detreminación de luz**

La intensidad de la luz es uno de los factores más importantes para el crecimiento fotosintético de las microalgas. Los sistemas de cultivos de microalgas pueden ser iluminados por luz artificial, luz solar o ambas. Entre los sistemas de cultivo de algas

con iluminación natural con grandes áreas de iluminación se encuentran los estanques abiertos, los llamados platos planos o flat plates, los airlift tubulares o de tipo serpentín y los de tipo inclinado, entre otros (Chisti 2007). Los sistemas de fotobiorreactores empleados a nivel laboratorio son iluminados interna o externamente por luz artificial con lámparas fluorescentes y diodos emisores de luz (light emitting diodes, LED) entre otros.

Para que la luz artificial sea de utilidad en el proceso fotosintético de las microalgas, los fotones generados deben encontrarse a una longitud de onda de entre los 600 y 700 nm. Al comparar distintas fuentes de luz artificial, incluyendo luz fría fluorescente, lámparas incandescentes, halógenas, AlInGaP II (fosforo de aluminio, indio y galio, con una longitud de onda de 643 nm) y diodos emisores de luz (light emitting diodes, LED), se encontró que el LED del tipo AlInGaP II son la fuente de luz más eficiente y económica para el crecimiento de microalgas (Kommareddy y Anderson 2003). La tasa específica de crecimiento de las microalgas depende de la intensidad de la luz. El crecimiento de las microalgas se incrementa conforme la intensidad de luz aumenta. Cuando la tasa de crecimiento llega a su punto máximo, ésta disminuye con el incremento de la intensidad de la luz debido a la fotoinhibición (Bohne y Linden 2002). Este patrón de crecimiento en relación con la intensidad de la luz se observa en la mayoría las especies de microalgas (Fábregas et al. 1998). Se ha reportado que la producción y acumulación de metabolitos de interés comercial se ve afectada por la radiación de luz blanca en algas, hongos y bacterias (Martin 2010). Sin embargo, la intensidad y el régimen de la iluminación varían con el género de microalga.

Fábregas et al. (1998) estudiaron el efecto de la intensidad de la luz en la a microalga *Haematococcus pluvialis*, observando que a una intensidad de  $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  la acumulación de astaxantina fue mayor en comparación a la observada con una intensidad de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . De igual manera, Barbosa et al. (2004) mostraron un remarcado incremento en la concentración de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* cuando se incrementó la intensidad de luz de 50 a  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La fotoinhibición es un proceso dependiente del tiempo, en el cual ocurre un daño irreversible pocos minutos después de iniciado el estrés por luz, con un daño que excede el 50 % después de 10 o

20 minutos (Pulz 2001). Sin embargo, se han encontrado pocas referencias disponibles acerca de la fotoadaptación, la inhibición por luz o efectos de saturación en fotobiorreactores

### **1.2.5.3. Requerimiento de Nitrato y Fosfato**

Las algas requieren nutrientes en disolución. Los nitratos y los fosfatos son dos nutrientes de importancia, al igual que el sodio y los silicatos (Dan-Telah y col., 2004). Existen varios medios de cultivo formulados disponibles, pero los requerimientos son distintos para cada variedad de microalga. Por otra parte, se debe tomar en cuenta el objetivo del experimento para definir la composición del medio de cultivo. Por ejemplo, si la finalidad es una alta productividad de biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ ), altas concentraciones de nitratos y fosfatos son esenciales para el crecimiento (García-Malea et al. 2006).

Para inducir la producción de metabolitos y compuestos de interés comercial, la manipulación en la concentración de nitratos es una técnica común para simular un ambiente de estrés en la microalga. Esto sugiere que una alta relación de carbono nitrógeno (C/N) resulta ser eficiente para inducir la biosíntesis de astaxantina, un carotenoide de interés comercial (Chen y John 1991; Chen y Chen 2006). La limitación de nitrógeno en presencia de un exceso de fuentes orgánicas de carbono, como acetato y glucosa, ha sido efectiva en la producción de carotenoides en cultivos mixotróficos (Ip y Chen 2005).

Por otra parte, la presencia de iones de hierro (Fe) y magnesio (Mg) en cultivos de microalgas también ha sido estudiada, un exceso de Fe estimula la acumulación de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* (Harker et al. 1996). Fábregas et al. (1998), estudiaron la deficiencia de Mg y N en la acumulación de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*, observando que con una deficiencia de Mg la densidad celular incrementa, mientras que con una deficiencia de N la acumulación de astaxantina se ve favorecida.

Varios estudios recientes han descrito las condiciones de crecimiento que se pueden utilizar para la escala industrial en marcha de la producción de lípidos de las algas. El proceso de dos etapas sugerido por Rodolfi et al. (2009) alcanzaron 0,2 kg / m<sup>3</sup> / d de aceite de microalgas por vía fotosintética. En esta configuración, las células se cultivaron primero en condiciones de nutrientes suficientes para la acumulación de biomasa seguida de privación de nutrientes para la síntesis de lípidos. Sin embargo, un estudio realizado por (Stephenson et al. 2010) encontró que la estrategia más eficaz para lograr un alto contenido de lípidos en *C. vulgaris* fue permitir que las células agotaran su N<sub>2</sub> naturalmente, en lugar de transferirlas a un medio que carece completamente de N<sub>2</sub> (Scott et al. 2010).

#### **1.2.5.4. Condiciones de estrés**

Las microalgas sintetizan ácidos grasos como precursores para la síntesis de varios tipos de lípidos, los cuales varían dependiendo de la especie: lípidos polares, lípidos neutrales, ceras, esteroides, fosfolípidos, glicolípidos, carotenoides, terpenos, tocoferoles, quinonas (Hu et al. 2008). Sin embargo, sólo los lípidos neutrales son adecuados para la producción de biodiesel y de éstos, los triacilglicéridos.

El contenido total de los lípidos en las microalgas puede variar desde 1 hasta 90% del peso seco, dependiendo de la especie y de las condiciones de cultivo (Spolaore et al. 2006; Chisti 2007). Cuando las microalgas se someten a condiciones de estrés impuestas por estímulos ambientales químicos y físicos, solos o en combinación, ocurre síntesis y acumulación de grandes cantidades de triglicéridos, acompañada por considerables alteraciones en la composición de los lípidos y ácidos grasos. Los principales estímulos químicos son la deficiencia de nutrientes (nitrógeno, fósforo, azufre y silicio), la salinidad y el pH del medio de cultivo (Chisti 2013); los físicos son la temperatura y la intensidad luminosa (Cornet y Dussap 2009; Chen et al. 2011; Takache et al. 2012). Por ejemplo, si el nitrógeno está restringido (Chisti 2013), o extremadamente incrementado (Feng et al. 2011), las microalgas tienden a producir más lípidos que carbohidratos.



La deficiencia de nitrógeno es, con respecto a los nutrientes, el factor que más afecta el metabolismo de los lípidos (De et al. 1999; Li et al. 2008c; Hu et al. 2008; Mendoza et al. 2008; Solovchenko et al. 2008; Gouveia y Oliveira. 2009; Rodolfi et al. 2009). Además de estos factores, la fase de crecimiento y la edad del cultivo también afectan al contenido y composición de los ácidos grasos, observándose un mayor contenido de lípidos en la fase estacionaria con respecto a la fase logarítmica (Spolaore et al. 2006; Hu et al. 2008). Con respecto a la fase de crecimiento, Bigogno et al. (2002) reportaron que en *Parietochloris incisa* se observó un alto contenido de triacilgliceroles (43% del total de ácidos grasos) en la fase logarítmica, el cual aumentó hasta 77% en la fase estacionaria.

Olguín et al. (2001), reportaron que el contenido de lípidos totales de *Spirulina sp.* (*Arthrospira*) aumentó de 8% a 28.6% del peso seco, cuando se sometió a una limitación por N y además se cultivó a una intensidad luminosa muy baja ( $66 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) en un medio complejo. Asimismo, *Neochloris oleoabundans* puede acumular hasta el 80% de sus lípidos totales en forma de triglicéridos y la mayoría de sus ácidos grasos son saturados en el rango de 16 a 20 carbonos, bajo condiciones de estrés (Tornabene et al. 1983), lo cual la coloca como una de las especies con mayor potencial para la producción de biodiesel. También se ha reportado que con una alta intensidad luminosa, se alcanzaron los más altos contenidos de ácidos grasos totales (Solovchenko et al. 2008).

Con respecto a la temperatura, se ha observado en muchas microalgas y cianobacterias que la insaturación de los ácidos grasos se incrementa cuando desciende la temperatura y viceversa, cuando la temperatura aumenta, aumenta la saturación de los ácidos grasos. Con relación al efecto de la intensidad luminosa, ésta influye notablemente en la composición química en general, el contenido de pigmentos y en la actividad fotosintética. Generalmente, una intensidad luminosa baja induce la formación de lípidos polares (fosfolípidos y glucolípidos), los cuales están funcional y estructuralmente asociados a las membranas celulares (Hu et al. 2008). En contraste, las altas intensidades

luminosas influyen en la disminución del contenido total de lípidos polares con el concomitante incremento de la cantidad de lípidos de almacenamiento, principalmente triglicéridos (Olguín et al. 2001; Khotimchenko y Yakovleva 2005; Solovchenko et al. 2008).

### **1.2.6. Cosecha**

La cosecha de las algas consiste en la recuperación de la biomasa en el medio de cultivo, etapa que puede contribuir de un 20 a un 30% del costo total de producción. Con la finalidad de remover la gran cantidad de agua y procesar grandes volúmenes de biomasa de algas, un método de cosecha adecuado podrá involucrar una o más etapas y será realizado en sistemas físicos, químicos y/o biológicos. La experiencia ha demostrado que todavía no existe un método de cosecha universal y esa es un área en que hay bastante espacio para investigación y desarrollo (Mata et al. 2010). La elección de la técnica de cosecha dependerá de las características de la microalga, por ejemplo tamaño, formato, densidad y de los volúmenes de producción. Los métodos más comunes incluyen sedimentación, centrifugación, filtración, ultra-filtración, floculación y flotación, algunos de los cuales bastante energéticamente intensivos (Brennan y Owende 2010).

La selección de la técnica adecuada de cosecha es, por tanto, fundamental en la producción de biomasa de algas. Y como los métodos son caros, ese debe ser un factor considerado en la selección de especies a ser utilizadas. Por ejemplo, células pequeñas y de baja densidad vuelven la recuperación de la biomasa aún más difícil. En ese caso, se usa floculación para aglutinar las células de las microalgas, aumentando el tamaño de las partículas y, por tanto, facilitar la sedimentación y posterior recuperación por centrifugación o filtración. Filtros - prensa bajo presión o vacío pueden ser usados para recuperar grandes cantidades de biomasa, pero ese tipo de proceso solamente es adecuado para microalgas mayores. También la microfiltración por membrana y la ultra-filtración pueden ser usados alternativamente a la filtración convencional para la recuperación de la biomasa de algas, siendo más adecuados para células frágiles y de

pequeña dimensión, solo que son más caros, habiendo necesidad de sustitución periódica de la membrana y de bombeo.

Para elegirse el procedimiento de cosecha adecuado, se debe considerar la calidad necesaria y el valor agregado del producto deseado. Por un lado, en caso de que sea un producto de relativo bajo valor (como biocombustibles), deberá utilizarse solamente sedimentación por gravedad, posiblemente reforzada por floculación. Por otro lado, para productos de alto valor agregado y que necesiten de alta calidad, tales como aditivos de alimentos o con aplicaciones farmacológicas, es recomendado el uso de centrifugas que pueden procesar grandes volúmenes de biomasa. Aunque a un costo considerable, las centrifugas son adecuadas para concentrarse rápidamente cualquier tipo demicroorganismo. Además de eso, esos dispositivos pueden ser higienizados y esterilizados fácilmente de forma a evitar efectivamente la contaminación.

Otro criterio básico para la selección del proceso de cosecha es su potencial para ajustar el nivel aceptable de humedad de forma a facilitar los procesos posteriores. La biomasa cosechada por sedimentación posee humedad más alta que aquella centrifugada. Una vez que la reducción de la humedad por calor es aún más cara que la centrifugación, el uso de ese método de cosecha es justificable en caso de que se necesite de la biomasa deshidratada.

Después de la separación del medio de cultivo de la biomasa de algas (5-15% peso seco), esta debe ser rápidamente procesada, pues es altamente perecible, pudiendo dañarse en pocas horas, dependiendo de la temperatura ambiente (Mata et al. 2010); Brennan y Owende 2010). El secado puede ser hecho por los mismos métodos usados en la industria alimenticia, como al sol, en bandejas sin o con circulación forzada de aire, en tambor rotatorio, en lecho fluidizado y liofilización. La elección del método dependerá, nuevamente, del balance entre costo, valor agregado y demanda (como termolabilidad) del producto. En el caso de la producción de biocombustibles, el balance energético también es un factor de gran importancia.

### **1.2.7. Lípidos**

Los principales indicadores que determinan el potencial de una microalga para producción de biodiesel son el crecimiento, el contenido de lípidos, el perfil y la productividad de los mismos (Gong y Jiang 2011). Los lípidos de acuerdo al tipo de estructura química y polaridad, se clasifican en polares (fosfolípidos y glicolípidos) y neutros (mono, di y triacilglicéridos, ceras, carotenoides). Aunque casi todos los tipos de lípidos pueden ser extraídos, sólo los triacilglicéridos pueden ser fácilmente transesterificados en biodiesel por los métodos tradicionales (Gong y Jiang 2011).

#### **1.2.7.1. Detección de lípidos**

Un punto crítico para el inicio de este proceso es la identificación de cepas de algas que posean cantidades de lípidos totales en general y lípidos neutros en particular y que sean capaces de acumulación rápida bajo diversas condiciones. Dentro de la identificación de especies de algas deseables, un paso crucial es el “screening” de contenido lipídico. Una manera de detectar e identificar especies de algas que contienen aceite de forma rápida es mediante la utilización del reactivo Sudan IV (Umarah 2011).

#### **1.2.7.2. Determinación de lípidos polares y neutros**

El método de fluorescencia con Rojo Nilo es una técnica que se ha venido utilizando para la determinación de lípidos intracelulares y es considerada como una herramienta útil para la cuantificación de lípidos neutros en microalgas. El rojo Nilo (9-diethylamino-5H-benzo [ $\alpha$ ]phenoxazine-5-one. Sigma–Aldrich) ( $C_{20}H_{18}N_2O_2$ , MW: 318.37; SC biotechnology, Cat. No. 203747A), es un colorante fotoestable, intensamente fluorescente en solventes orgánicos y ambientes hidrofóbicos, pero tiene baja intensidad en agua (Else et al. 2007). La máxima emisión del Rojo Nilo es de una menor longitud de onda (desplazamiento al azul) cuando el medio es más polar, lo que permite diferenciar entre lípidos polares y neutros de acuerdo a la emisión de las longitudes de onda. La longitud de onda emitida por lípidos polares y neutros usando la técnica de tinción rojo Nilo es de 610 nm y 580 nm, respectivamente (Chen et al. 2011).

El Rojo Nilo entra a todas las estructuras dentro de la célula, pero el color amarillo-oro fluorescente sólo se manifiesta cuando el colorante penetra en los glóbulos de lípidos neutros intracelulares. Cooksey et al. (1987) demostró una correlación lineal entre la fluorescencia del Rojo Nilo y el contenido total de lípidos neutros de las microalgas. Una de las más grandes ventajas que presenta esta técnica es que las células teñidas con Rojo Nilo siguen siendo viables, lo que hace la técnica útil para la selección de células que se están reproduciendo activamente (Doan y Obbard 2011).

### **1.2.7.3. Extracción de lípidos**

Los productos bioquímicos primarios utilizados para la síntesis de biocombustibles (lípidos neutros para el biodiesel y azúcares simples para el bioetanol) son normalmente encapsulados dentro de las estructuras celulares de las microalgas, la ruptura de la célula es un paso esencial en el procesamiento, ya que libera los productos intracelulares mencionados de la matriz celular de las microalgas (Halim et al. 2012). La mayor parte de los métodos de ruptura de las células aplicados a las microalgas, fueron adaptados de aquellos usados en microorganismos no fotosintéticos y de las plantas oleaginosas, e incluyen prensaje, sonicación, uso de solventes, homogeneización a alta presión, autoclavado o uso de enzimas.

La extracción depende del componente a ser extraído, de la especie usada y de su etapa de crecimiento. El método de cosecha y secado (en caso de que haya sido hecha) también influyen en la eficiencia de la técnica usada. Esta también es una etapa cara y la elección de la técnica adecuada puede determinar la sustentabilidad del biocombustible de microalgas. Su costo es variable, pero ha sido estimado en cerca de US\$ 1.80/kg (comparado a US\$ 0.50/kg de aceite de palma) (Chisty 2007; US DOE, 2010).

### **1.2.8. Procesamiento final y uso de co-productos**

La conversión de los Triglicéridos extraídos en biodiesel, utilizando metanol en la transesterificación para dar los ésteres metílicos de los ácidos grasos presentes, es hasta ahora la tecnología estándar a nivel industrial, y poco hay que añadirle a esta tecnología,

además de que el uso de la glicerina resultante hace una importante contribución a la economía. (Scott et al. 2010)

### 1.3. JUSTIFICACIÓN

Las metodologías de diseño y escalamiento para fotobioreactores son pobremente desarrolladas. Independientemente de la configuración de un reactor específico empleado, es preciso abordar varios problemas esenciales (Weissman et al. 1988); por ejemplo una provisión de luz efectiva y eficiente; suministro de dióxido de carbono; remover el oxígeno generado fotosintéticamente ya que este puede inhibir el metabolismo o dañar el cultivo si se le permite acumularse; y una tecnología de escalamiento sensible del fotobioreactor. La productividad de biomasa de un fotobioreactor está estrechamente ligada al medio de cultivo necesario para la cepa de microalga seleccionada. Algunos factores medioambientales, por ejemplo temperatura y suministro de nutrientes minerales, son relativamente fácil de controlar, pero otros como el suministro de radiación solar son más difíciles de regular. La productividad está determinada por la velocidad de crecimiento la cual, por una mezcla de dinámica de fluidos y temperatura, están en función de la captación de luz dentro del reactor, al cual las células están sujetas. En cultivos densos de microalgas, la penetración y la absorción de la luz es impedida por ellas mismas (Rabe y benoit 1962). Esos factores afectan la captación de radiación dentro del cultivo. Consecuentemente, dentro de un fotobioreactor existen zonas con diferentes niveles de iluminación. Esas zonas pueden tener diferentes volúmenes. La cantidad de tiempo en el que las células se encuentran en diferentes zonas de iluminación está en función de la dinámica de fluido del cultivo (Phillips y Myers 1954; Terry 1986; Grobbelaar 1994). En adición a la afectación de la disponibilidad de luz, el movimiento de fluidos afecta también la conducta en el transporte de elementos por ejemplo en la disponibilidad de dióxido de carbono y otros nutrientes. En un sistema óptimo donde ningún otro factor es limitante, la disponibilidad de luz determina la velocidad de la fotosíntesis y de la productividad. Sin embargo excesiva cantidad de luz puede ser dañina produciendo una respuesta fotoinhibitoria (Bannister 1979; Aiba 1982). La industria aeronáutica requiere biocombustibles alternos al petróleo para impulsar sus aviones tanto militares como comerciales ya que los costos de los combustibles empleados actualmente limitan de manera alarmante esta actividad, paralelamente a esto existen muy pocos casos de procesos biotecnológicos documentados que utilicen microorganismos capaces de sintetizar lípidos de bajo peso

molecular con propiedades fisicoquímicas similares a la turbosina motivo por el cual es altamente deseable desarrollar procesos de producción masiva de algas con semejantes capacidades. En un intento por subsanar las necesidades que ésta creciente industria demanda.



## **1.4. HIPÓTESIS**

Con el desarrollo del proceso y escalamiento de las microalgas productoras de Lípidos de bajo peso molecular se logrará estandarizar las condiciones de cultivo para una mejor producción de las mismas en un fotobioreactor tipo Air-lift.

## **1.5. OBJETIVOS**

### **1.5.1. OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un proceso biotecnológico a nivel de fotobiorreactor para la síntesis de lípidos de bajo peso molecular con cepas de microalgas nativas de ambientes semi-desérticos.

### **1.5.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Aislar cepas de microalgas capaces de sintetizar lípidos intracelulares.
- Establecer las condiciones de cultivo batch para el crecimiento de las cepas de microalgas aisladas.
- Evaluar la capacidad de las microalgas aisladas para sintetizar lípidos intracelulares bajo el sistema de cultivo batch.
- Seleccionar las cepas de microalgas que produzcan lípidos neutros.
- Establecer las condiciones de operación del fotobiorreactor para el escalamiento del proceso a nivel de laboratorio.
- Evaluar la capacidad de las microalgas aisladas para sintetizar lípidos intracelulares bajo el sistema de cultivo continuo en el fotobiorreactor tipo Air lift.
- Optimizar la eficiencia del proceso a través de la aplicación de factores de estrés que estimulan la síntesis de lípidos neutros por las microalgas seleccionadas.

# **AISLAMIENTO, CULTIVO Y SELECCIÓN DE CEPAS LIPÍDICAS MEDIANTE TINCIÓN CON SUDAN IV Y ESTABLECIMIENTO DE CEPARIO**

## **2.1 INTRODUCCIÓN**

El aislamiento y cultivo de microalgas es un laborioso proceso que consume mucho tiempo. Para ahorrar tiempo y costos, la mayoría de los estudios anteriores se aprovecharon de las colecciones de cultivos existentes, disponibles por un costo relativamente bajo; esto para mejorar los métodos de medición de lípidos, probar diferentes técnicas de extracción (Murray y Thomson 1977; Matsumoto et al. 2009; Wang et al. 2010), estudiar cómo el flujo de gas puede ser utilizado para estimular el crecimiento (Sheehan et al. 1998), y cómo la privación de nutrientes y las condiciones de estrés mediante diferentes intensidades de luz, podrían ser empleados para aumentar el contenido de lípidos en las microalgas (Liu et al. 2008; Imamoglu et al. 2009; Mandal y Mallick 2009; Pruvost et al. 2009; Dragone et al. 2011). Sin embargo, se ha reconocido la necesidad de ir más allá de las colecciones de cultivos existentes e iniciar nuevos aislamientos de microalgas que vivan en ambientes en específico.

Las microalgas son un grupo de microorganismos en su mayoría fotoautótrofos que incluye ambas especies, procariotas y eucariotas. Estos organismos pueden fotosintéticamente convertir CO<sub>2</sub> y minerales en biomasa, pero algunas especies también crecen heterotróficamente (Van Thang et al. 2012). De acuerdo a Goss (2005) las microalgas con potencial pueden pertenecer a cualquiera de las divisiones existentes; Cyanophyta (verde-azules), Prochlorophyta (cianobacterias verdes), Rhodophyta (rojas),

Pyrrhophyta (dinoflagelados), Cryptophyta (Cryptomonas), Chrysophyta (algas doradas: Diatomeas), Phaeophyta (pardas), Euglenophyta (euglenoides) o Chlorophyta (verdes).

Pueden crecer en la mayoría de los ambientes naturales, incluyendo el agua, las rocas y el suelo. Sus principales hábitats son de agua dulce, salobre y los ecosistemas marinos. Sin embargo no solo pueden ser encontradas y colectadas en ecosistemas acuáticos generales, tales como lagos, ríos y los océanos, sino también en ambientes extremos, como las aguas volcánicas y aguas saladas. El primer paso para establecer un cultivo de microalgas con potencial para producción de biocombustibles es la colecta de las mismas; ya que las condiciones para definir los sitios de colecta no son restrictivas, se pueden obtener numerosas muestras para hacer observaciones de morfología y así facilitar su aislamiento. Es importante considerar que muestras de agua y sedimentos de ambientes acuáticos que se someten a la fluctuación y/o condiciones adversas ocasionales, proporcionan una mayor probabilidad de aislar microalgas con alta acumulación de lípidos. Muy probablemente estas condiciones favorecerían microalgas más robustas y oportunistas (rápido crecimiento) con habilidades de supervivencia superiores (por ejemplo, por la acumulación de lípidos de almacenamiento). Ejemplos de estos ambientes son rocas de zonas costeras (marea), esteros, charcas (depressiones en el suelo) y ríos. El aislamiento es un proceso necesario para obtener cultivos puros y presenta el primer paso hacia la selección de cepas de microalgas con potencial para la producción de biodiesel (Van Thanget al. 2012).

Aunque muchas especies han sido identificadas y aisladas para la producción de lípidos, actualmente no existe un consenso en cuanto a las especies que proporcionan la más alta productividad. Se espera que diferentes especies tengan mejor desempeño en diferentes condiciones acuáticas, geográficas y climáticas (Van Thang et al. 2012).

Cada micro-ambiente puede proporcionar cepas de algas con propiedades muy diferentes; en contraste con la manipulación de sólo unas pocas cepas de algas cultivadas individuales en el laboratorio para alta productividad de lípidos, una estrategia más eficiente y útil para identificar microalgas oleaginosas sería una investigación en profundidad y sistemática de un grupo taxonómico conjunto de microalgas en una amplia distribución geográfica y ecológica (Rismani et al. 2011).

Un punto crítico para el inicio de este proceso es la identificación de cepas de algas que posean cantidades de lípidos totales en general y lípidos neutros en particular y que sean capaces de acumulación rápida bajo diversas condiciones. Dentro de la identificación de especies de algas deseables, un paso crucial es el “screening” de contenido lipídico. Una manera de detectar e identificar especies de algas que contienen aceite de forma rápida es mediante la utilización del reactivo Sudan IV (Umarah 2011).

A diferencia de muchos cultivos agrícolas, una selección específica y domesticación de cepas de microalgas está todavía en su infancia, mientras que la tecnología para crecer microalgas económicamente con alto contenido de lípidos está todavía en desarrollo (Chisti 2007). Cada cepa de microalgas requiere de una cuidadosa selección y optimización con el fin de aumentar la productividad de lípidos, con el objetivo de proporcionar un sistema de cultivo con propiedades de rendimiento y producción de biocombustible mejorados (Dinh et al. 2009).

## 2.2. METODOLOGÍA

### 2.2.1. Descripción de los sitios

A-1 fue aislada del Laboratorio de Acuicultura de la Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad B, ubicada en el municipio de San Nicolás de los Garza, el 28 de Julio del 2011. La cepa A-3 se aisló del río Santa Catarina frente al parque España en Septiembre del 2011.

Mientras que la cepa A-4 se colectó de una zona árida y montañosa en el área de la Huasteca, en el municipio de Santa Catarina N.L., en Septiembre del 2011. Las cepas A-9 y A-29 fueron aisladas en Febrero del 2012 del parque Niños Heroes en Monterrey N.L. Las cepas A-12 e A-52 se aislaron de una zona de montañas siempre verdes y húmedas en un lugar llamado Las Adjuntas, municipio de Santiago N.L. en Marzo del 2012. A-14 se aisló el 14 de Octubre del 2011 del lado Oeste de la presa de la Juventud, ubicada en Marín N.L. Las cepas A-18, A-20 e A-43 fueron aisladas de un Lago ubicado en una zona urbana en la Colonia Cd. Solidaridad en el municipio de Monterrey N.L. el 31 de Octubre del 2011. Otra cepa que se aisló es la A-25 en un manto acuífero en Allende N.L. el 17 de Marzo del 2012. En el municipio de Los Ramones N.L., el 14 de Julio del 2011, la cepa A-33 fue aislada del río San Juan, varias veces contaminado por hidrocarburos generados en una Refinería cercana de PEMEX. La cepa A-35 fue aislada del río pesquería en el municipio de García N.L. el 23 de Febrero del 2012. A-37 fue aislada de agua dulce en la Ciudad de Can Cun, Quintana Roo el 12 de abril del 2012. A-38 se colectó de suelo siempre verde en el área Oeste de Cd. Universitaria el 16 Marzo del 2012. Las cepas A-40 e A-54 fueron aisladas de un arroyo proveniente de un Ojo de agua en el municipio de Bustamante al norte del estado de Nuevo León, el 5 de Abril del 2012. Las cepas A-46 y A-47 fueron aisladas de cuerpos de agua dulce del estado de Durango el 17 de Diciembre del 2011. La cepa A-58 fue aislada de la Laguna “Charel” ubicada en Tampico Tamaulipas el 01 de Agosto del 2012. La cepa A-61 fue aislada de una fuente en la ciudad de Morelia Michoacán el 13 de Julio del 2012. La cepa A-204 fue aislada de una importante reserva ecológica, hogar de varios organismos endémicos, en el desierto del estado de Coahuila, de la poza de la Becerra en el

municipio de Cuatrociénegas de Carranza, el 5 de Abril del 2013. Las figuras 6 y 7 señalan los sitios de muestreo.



Figure 6. Sitios de colecta., Municipios del estado de Nuevo León. Círculos en verde indican las locaciones de las colectas.

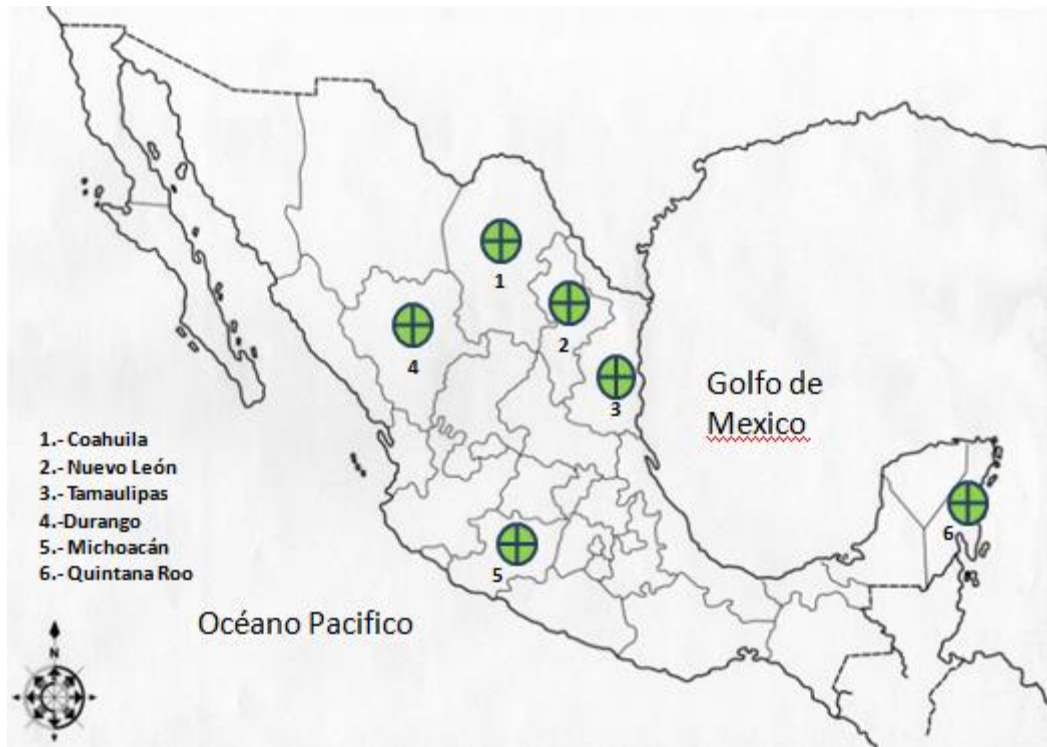


Figure 7. Sitios de colecta., Estados de México. Círculos en verde indican las locaciones de las colectas.

### 2.2.2. Aislamiento

Las microalgas fueron colectadas de aguas verdes poco profundas, o de suelos siempre verdes; en el laboratorio, las muestras de suelo fueron suspendidas en medio líquido para posteriormente procesarlas como muestras líquidas. Los líquidos se colectaron en tubos de plástico estériles con tapa. Además de que también se utilizó una red cónica para plancton, con una cubeta al final para coleccionar las microalgas de lugares como lagunas y lagos. Este dispositivo también puede ser construido con una malla de 64 micrómetros.

Se ubicó el sitio de colecta, y se realizaron las mediciones de temperatura y pH. Los especímenes colectados fueron transportados de regreso al laboratorio en bolsas de plástico o botes con tapa estériles en una hielera, para asegurar que las muestras no estuvieran expuestas a calor o altas temperaturas.

Posteriormente en el laboratorio, se procedió con la purificación y aislamiento de las muestras colectadas mediante la utilización de un sistema de filtración (VWR Scientific) (Figura 8), conectado a una bomba de vacío, dentro de una campana de flujo laminar (LABCONCO purifierclass II). Al sistema de filtración se le colocó una



membrana 60  $\mu\text{m}$  para la eliminación de protozoarios, materia organica o cualquier otro organismo que pudiera estar presente en la muestra, que sea mayor a la medida mencionada. Una vez que se pasó la muestra, se desechó la membrana y solamente se recuperó el líquido; posteriormente se colocó en el sistema una membrana de 5  $\mu\text{m}$  cuya función fue disminuir la población de bacterias y concentrar las microalgas, el medio líquido fue desechado y se conservó la membrana, para después aplicarle medio Bristol a presión para remover la biomasa recolectada, y recuperarla en un matraz Erlenmeyer de 250ml estéril. Posteriormente en una campana de flujo laminar, se transfirieron de 80 a 100 microlitros en placas con agar Bristol para el mantenimiento del alga, la cual se extendió utilizando un esparcidor estéril, mientras se iba rotando la placa. El matraz y la placa de Petri fueron colocados en una incubadora bajo una intensidad de luz de 32  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  a una temperatura de 25°C con un fotoperiodo de 12:12 mediante un temporizador.

#### 2.2.2.1 Antibióticos

Algunas bacterias fueron removidas por medio de la filtración; sin embargo fue necesario recurrir al uso de antibióticos (Cicloserina, Bacitracina y Tetraciclina) para reducir dramáticamente la población bacteriana y llevar a cabo la purificación de las microalgas. La solución de antibióticos se esterilizó por filtración (0.22 micrometros) y alícuotas de 1 y 5ml fueron almacenadas en refrigeración. Los cultivos fueron purificados en matraces Erlenmeyer con tapones de algodón conteniendo 50 ml de medio de bristol, Inoculados con 1% del cultivo; posteriormente se agregó la solución de antibióticos de acuerdo a las concentraciones de la tabla 3. Se dejó crecer el cultivo durante 48 horas en un shaker, Después de transcurridas las 48 horas las células fueron colectadas mediante centrifugación (8,000rpm / 10 min.) y lavadas con agua destilada; a continuación se procedió a resuspender el pellet y transferir las células lavadas a un nuevo matraz Erlenmeyer con 50 ml de bristol para agregar el siguiente tratamiento con antibióticos. Este proceso se repitió con un antibiótico a la vez y luego con mezclas de 2 o 3.



Figura 8. Sistema de filtrado VWR Scientific, conectado a una bomba de vacío para acelerar el proceso de filtración de las muestras de microalgas.

Tabla 3. Antibióticos para purificación de microalgas

Antibiótico	Concentración (mg/L)
Cicloserina	100
Bacitracina	400
Tetraciclina	10

La purificación en placas de agar se realizó para las microalgas que pudieron crecer en la superficie del agar. Este procedimiento se llevó a cabo transfiriendo colonias individuales a nuevas placas con antibióticos hasta que la microalga quedaba aislada. Las colonias individuales fueron tomadas de las placas de agar utilizando un asa para inocular la siguiente placa de agar con antibióticos.

#### 2.2.2.2. Aislamiento (método de estría cruzada)

Después de 10–14 días de crecimiento, colonias dominantes de microalgas fueron seleccionadas y transferidas a cajas de petri con agar Bristol sin antibioticos. Para aislar las cepas se utilizó el método de estría cruzada en placa (fig. 9), mediante un asa bacteriológica se inoculó la muestra en agar Bristol y se puso en incubación a 25°C a una intensidad lumínica de  $32\mu\text{mol m}^2 \text{seg}^{-1}$ , a un fotoperiodo 12:12, se monitoreo continuamente el crecimiento y cuando se observaron colonias formadas se tomaron cada una de ellas y se inocularon de nuevo por estría cruzada en otras cajas de Petri con medio Bristol, este paso se repitió hasta observar al microscopio solo una especie presente de microalga (las colonias aisladas correctamente se desarrollaron a lo largo de las líneas marcadas con el asa), posteriormente se tomó esa colonia para inocularla en medio Bristol libre de antibióticos contenido en un matraz de 250ml.

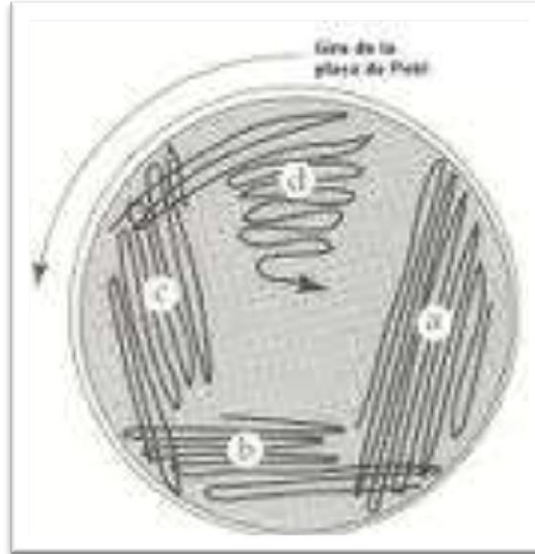


Figura 9. Aislamiento mediante estría cruzada utilizando un asa bacteriológica en una caja de petri conteniendo medio agar Bristol.

### 2.2.2.3. Aislamiento con pipeta capilar

Otro método que se utilizó para aislar microalgas mayores a  $10\mu\text{m}$  de diámetro fue mediante aislamiento con pipeta (Andersen y Kawachi 2005) Este método consistió en aislar una microalga con la ayuda de una pipeta Pasteur con punta reducida y/o con un capilar. Se colocó una gota de la muestra colectada en un portaobjeto y se colocó bajo el microscopio, donde las células de interés se succionaron por capilaridad con la pipeta y se pasaron a un portaobjetos limpio conteniendo una gota de agua estéril, se efectuaron al menos cinco transferencias sucesivas, asegurándose que la gota contenía un solo tipo de células; una vez realizadas las transferencias, la célula aisladas se colocaron en tubos de ensaye con 2-5 ml de medio de cultivo estéril.

### 2.2.3. Cultivo (Medio de crecimiento)

Para brindar las mejores condiciones de crecimiento a las microalgas aisladas, se utilizó el medio Bristol, compuesto por macronutrientes y elementos traza, a un pH de 6.8 (Tabla 4).

**Tabla 4.** Compuestos y cantidades de reactivos para medio Bristol

# COMPONENTE	CANTIDAD (mL/L)	CONCENTRACIÓN DE STOCK	CONCENTRACIÓN FINAL
NaNO <sub>3</sub>	10 ml	10g en 400 ml de H <sub>2</sub> O	2.94 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 ml	1g en 400 ml de H <sub>2</sub> O	0.17 mM
NaCl <sub>2</sub>	10 ml	3g en 400 ml de H <sub>2</sub> O	0.3 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 ml	3g en 400 ml de H <sub>2</sub> O	0.43 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 ml	7g en 400 ml de H <sub>2</sub> O	1.29 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 ml	1g en 400 ml de H <sub>2</sub> O	0.43 mM

Todos los matraces con las cepas aisladas de la A-1 a la A-70, fueron incubados en agitación continua en un shaker a 150rpm a 25°C, a una intensidad lumínica de 32μmol m<sup>2</sup> seg<sup>-1</sup> mediante lámparas fluorescentes de luz blanca de 20W, y a un fotoperiodo de luz-oscuridad de 12:12, los cuales sirvieron como fuente de inóculo para los experimentos diseñados.

#### 2.2.4. Detección de lípidos (Sudan IV)

Para la detección de la presencia de lípidos en las especies de microalgas aisladas, se utilizó el método de tinción con el reactivo sudan IV, el cual se realizó con éxito para una buena selección de especies de microalgas que contenían aceite. Del Sudán IV (C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O, MW: 380.49; unichem, Cat. No. 26105) se colocaron 0.3 gramos en 75 ml de etanol al 95% y se aforaron a 100 ml., el procedimiento consistió en colocar una muestra de cada una de las 70 cepas aisladas directamente en un portaobjetos, posteriormente se extendió con un asa bacteriológica y se dejó secar la muestra al medio ambiente; al tener la muestra totalmente seca, se colocaron unas gotas del Sudan IV cubriendo la muestra por aproximadamente 9 minutos sin dejarla secar, luego se hizo un lavado con Xilol para eliminar los restos del colorante y finalmente se lavó la muestra con H<sub>2</sub>O destilada. Al observar las muestras bajo el microscopio, gotas de color rojo eran claramente visibles en las células que contenían una cantidad importante de lípidos.

### **2.2.5. Establecimiento y mantenimiento de cepario**

Se establecieron condiciones de mantenimiento básicas para la mayoría de las especies, sin embargo en ocasiones fue necesario llevar a cabo modificaciones, que dependían de los requerimientos de la especie de interés.

El mantenimiento de las cepas se realiza tanto en medio líquido como en sólido. Los cultivos líquidos se mantienen en recipientes de volumen pequeño, en matraces Erlenmeyer de 250ml o en tubos de ensayo de 25-50 ml mientras que los cultivos sólidos se mantienen en cajas de petri o en tubos de ensayo de 25-50 ml conteniendo agar Bristol. La transferencia de los cultivos se realiza generalmente cada 20-25 días, dependiendo del crecimiento de la cepa; y las inoculaciones se hacen bajo una atmósfera estéril en una cámara de flujo laminar (Labconco purifier class II), en presencia de mecheros de gas. Para asegurar que el área donde se realizaron las transferencias estuviera libre de contaminación, tanto la mesa de trabajo así como la cámara de flujo laminar se limpiaron previamente con 2 soluciones desinfectantes (etanol al 70%, cloro 4%) así como la utilización de luz UV. Por otro lado, con la finalidad de asegurar algunas cepas de interés, éstas se sembraron por triplicado. Por último se llevó a cabo la rotulación de los recipientes con el nombre y origen de la especie, fecha de inoculación y tipo de medio de cultivo; para finalmente colocarlos en condiciones favorables de luz  $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  y  $25^{\circ}\text{C}$  de temperatura para su crecimiento.

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Muestras colectadas

Se colectaron un total de 350 muestras de microalgas de los ambientes naturales, incluyendo el agua, las rocas y el suelo. Así como también de ambientes extremos como aguas termales y la importante reserva ecológica, hogar de varios organismos endémicos, en el desierto del estado de Coahuila(4 Cienegas), abarcando un total de 29 municipios de 9 estados de la República Mexicana. Para posteriormente llevar a cabo la purificación y aislamiento (Fig. 10).

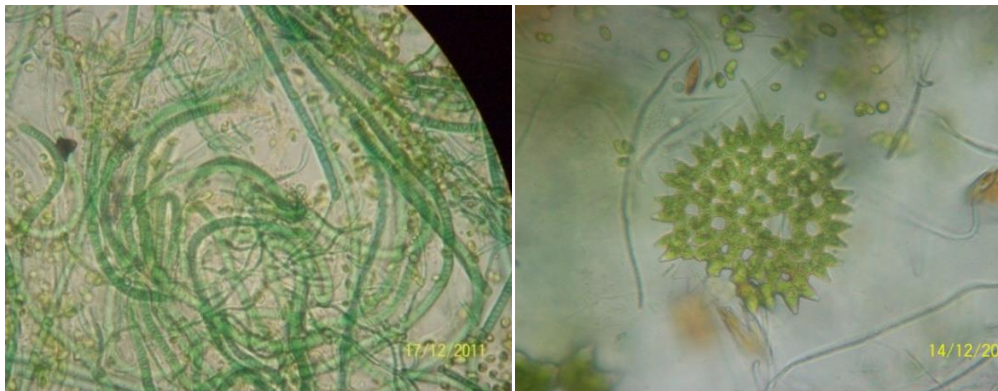




Fig 10.- Muestras colectadas en 29 municipios de 6 Estados de México

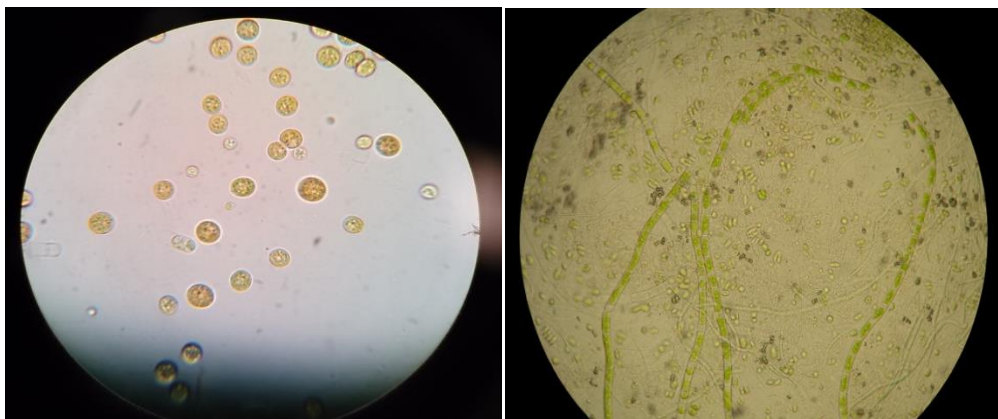
### 2.3.1.1 Muestras de microalgas al microscopio

Al poner las muestras colectadas bajo el microscopio, se lograron observar distintos géneros contenidos en cada una de ellas (Fig. 11).



A

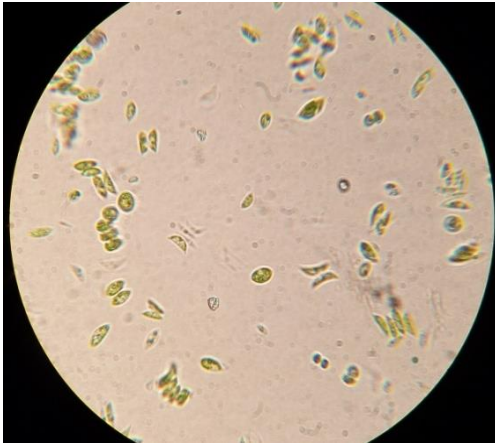
B



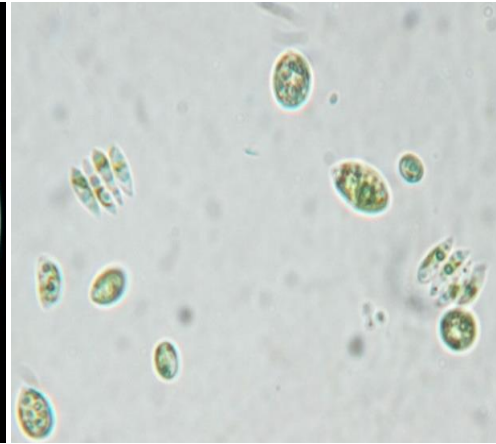
C

D

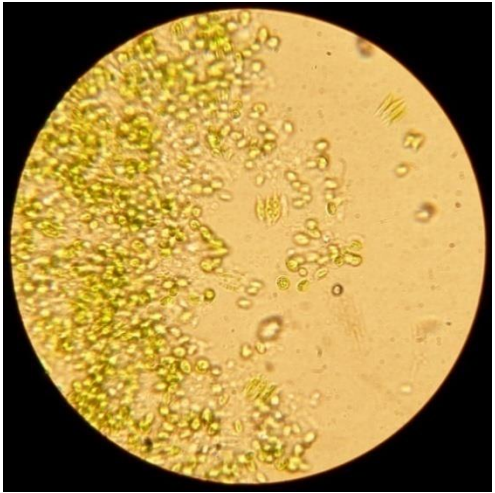




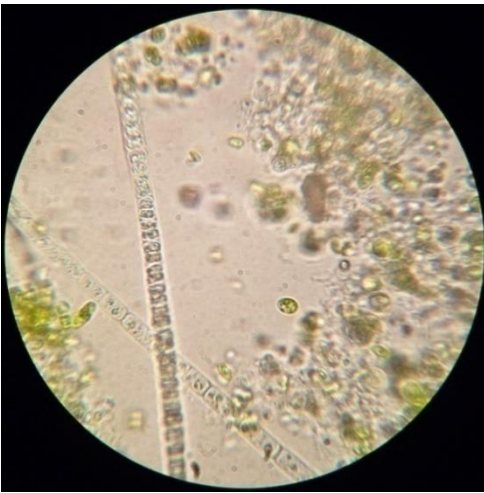
E



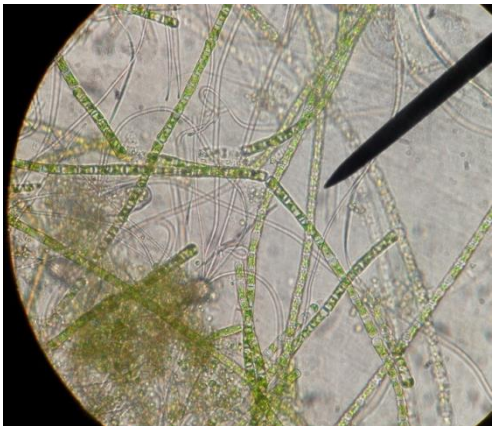
F



G



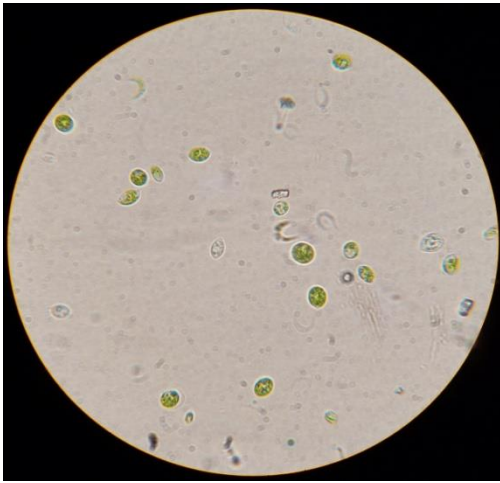
H



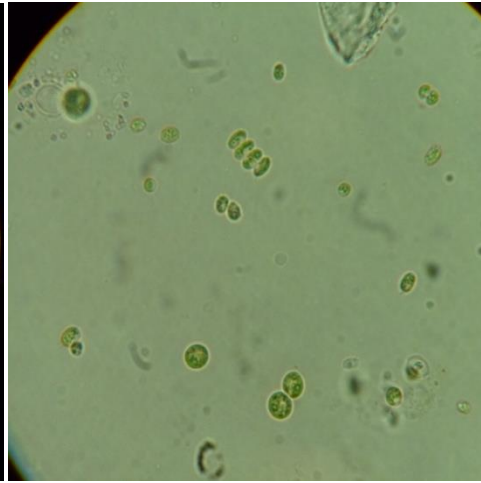
I



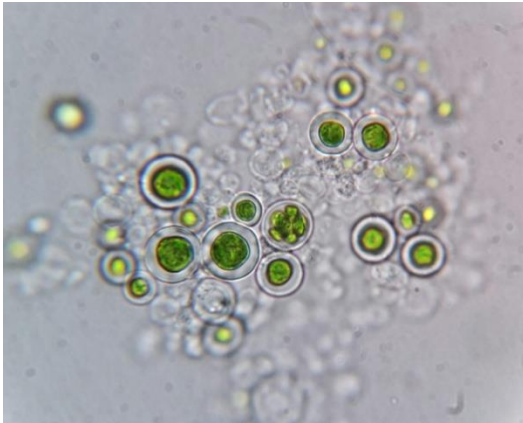
J



K



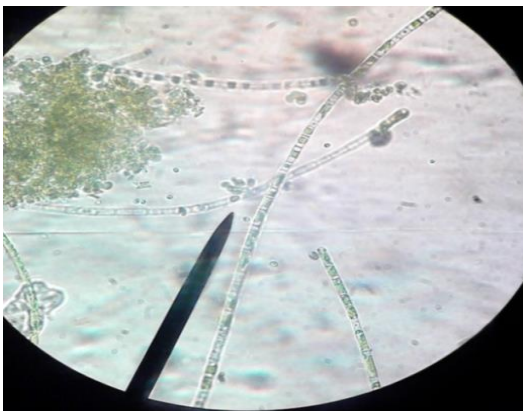
L



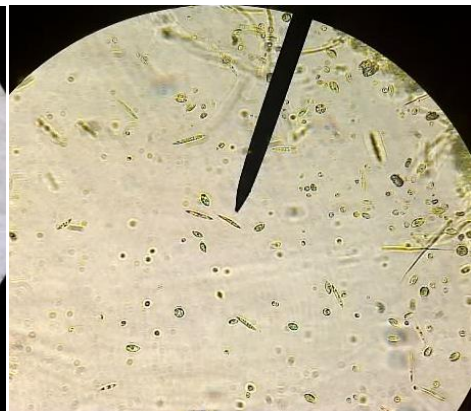
M



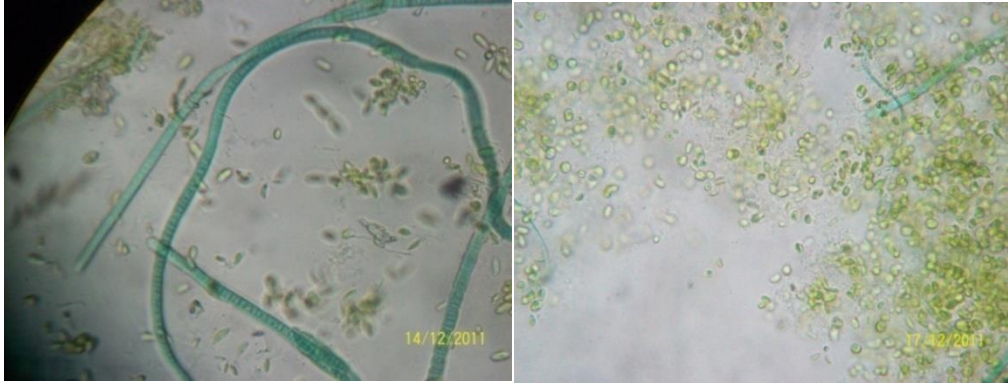
N



O



P



Q

R

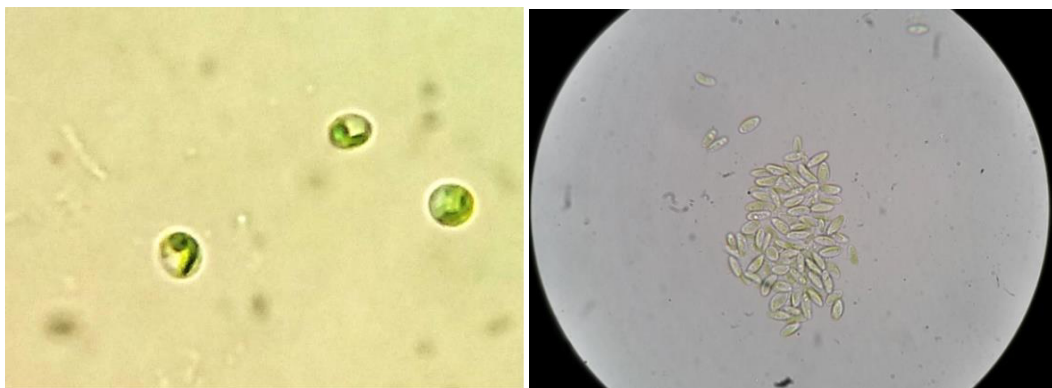
Fig 11.- Imagen de 18 muestras de microalgas colectadas vistas al microscopio, conteniendo distintos géneros en cada una de ellas. A (M 34), B (M 2), C (M104), D (M 48), E (M 151), F (M 143), G (M 187), H (M 155), I (M 30), J (M 45), K (M 156), L (M 163), M (M 211), N (M 165), O (M 196), P (M 200), Q (M 5), R (M 10)

M= Muestra

### 2.3.2. Aislamientos y Establecimiento de cepario

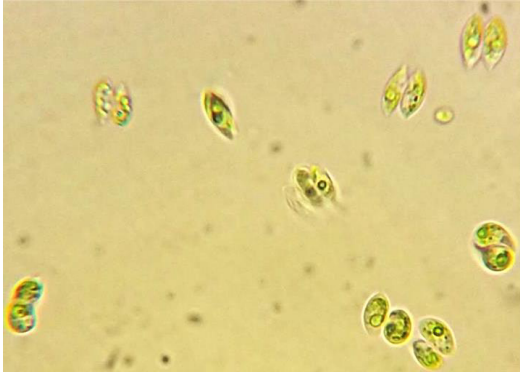
#### 2.3.2.1 Fotos de cepas aisladas

Se aislaron un total de 70 cepas (A-1 a A-70) de las 350 muestras colectadas realizando dicho propósito utilizando las diferentes técnicas de aislamiento como pipeta capilar y estría cruzada (Fig. 12).

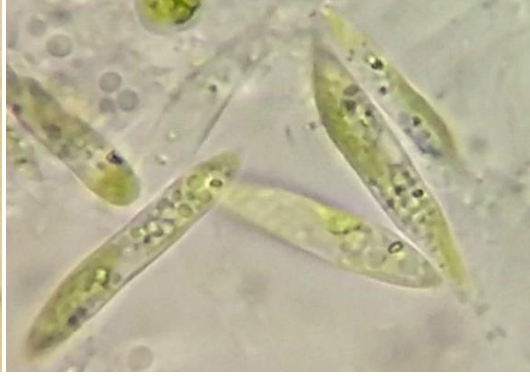


A-1

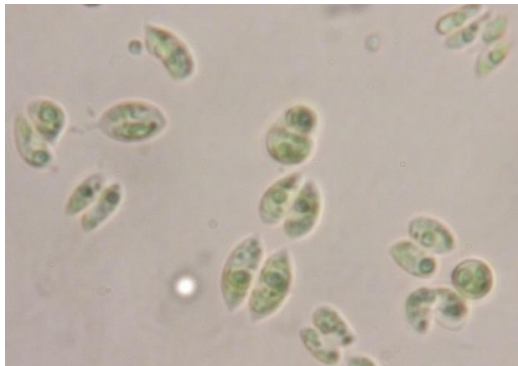
A-2



A-3



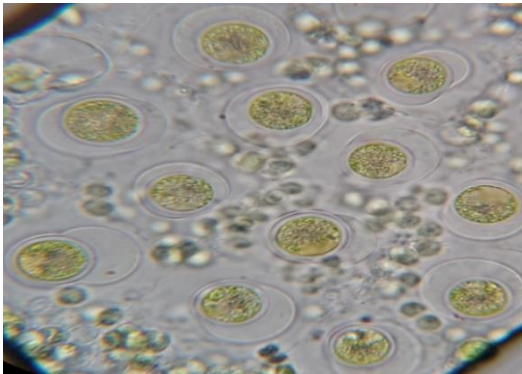
A-4



A-5



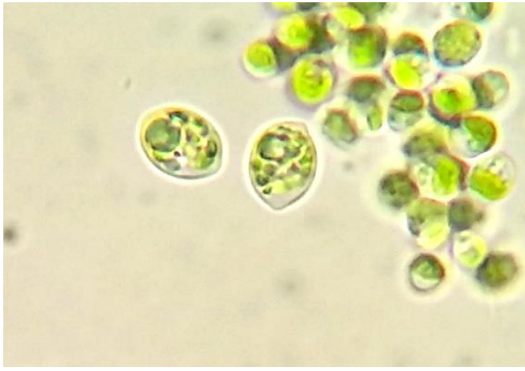
A-6



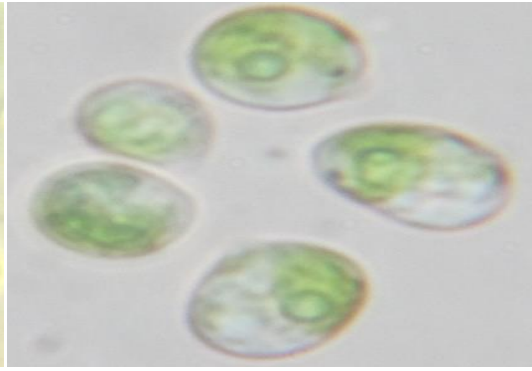
A-7



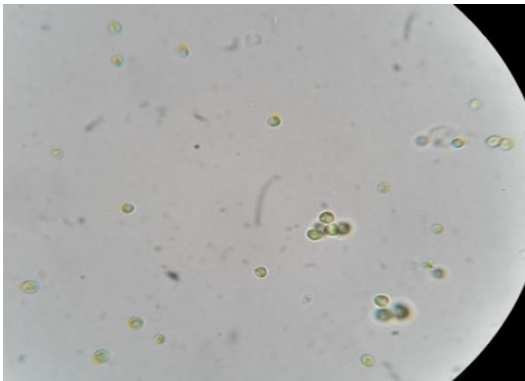
A-8



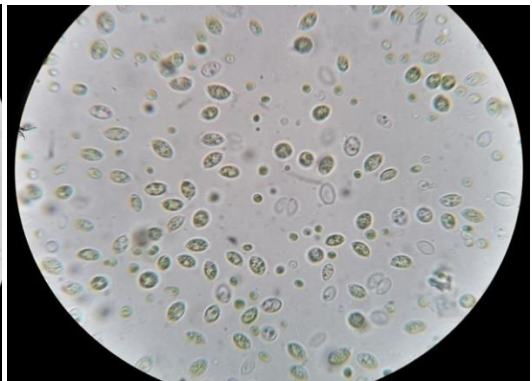
A-9



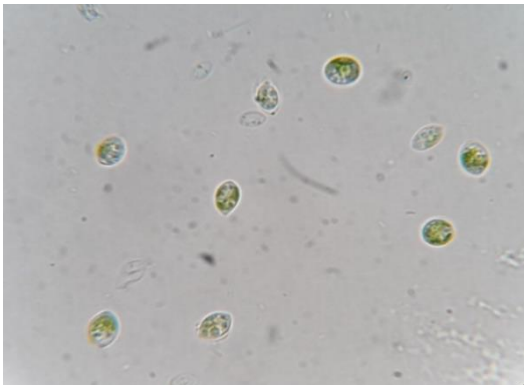
A-10



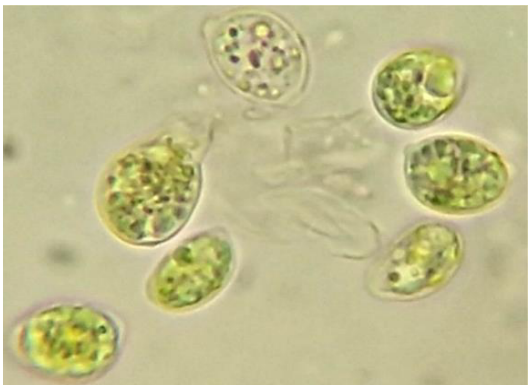
A-11



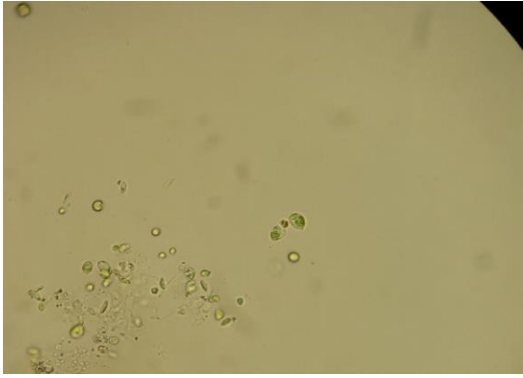
A-12



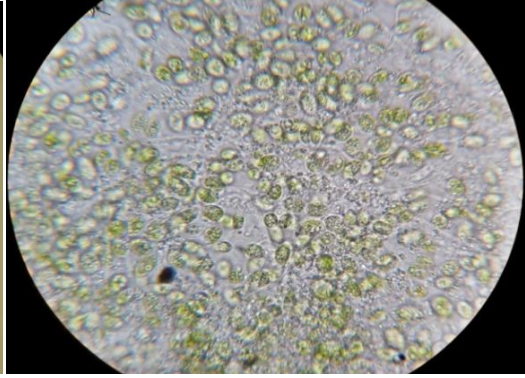
A-13



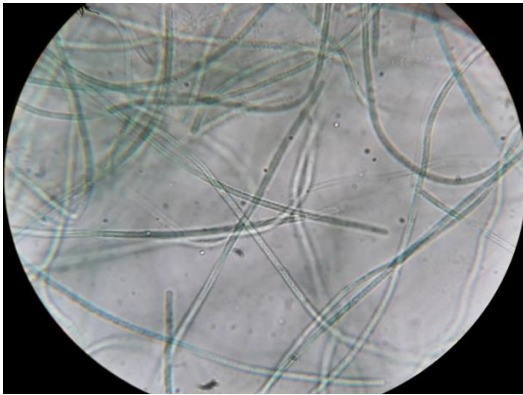
A-14



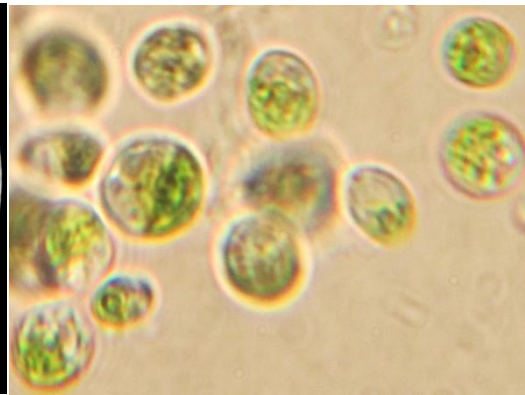
A-15



A-16



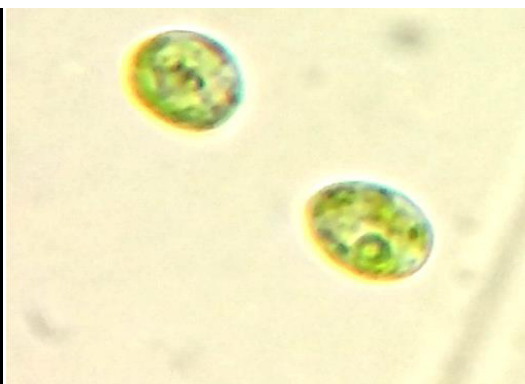
A-17



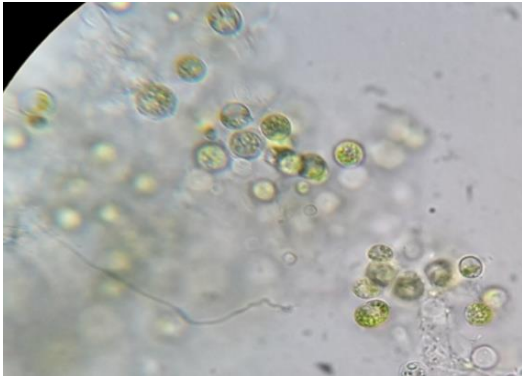
A-18



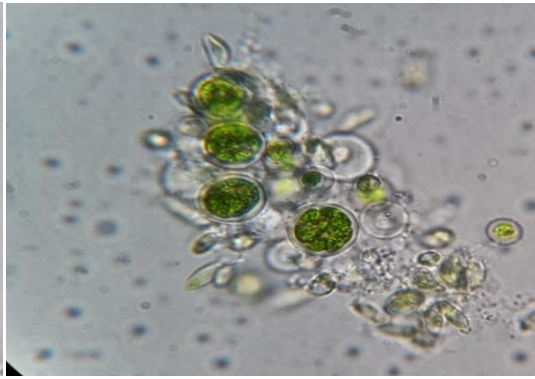
A-19



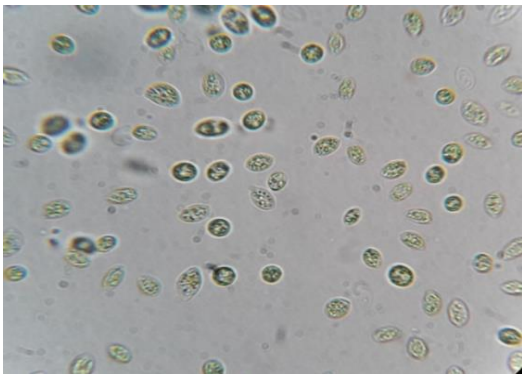
A-20



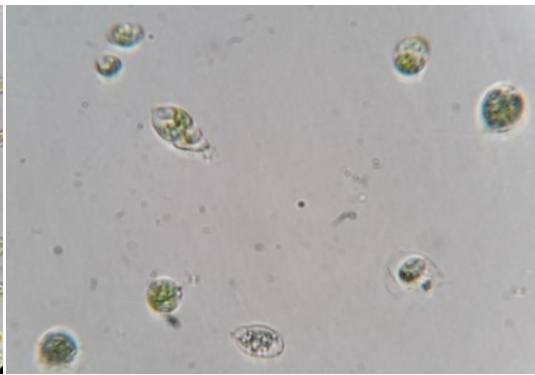
A-21



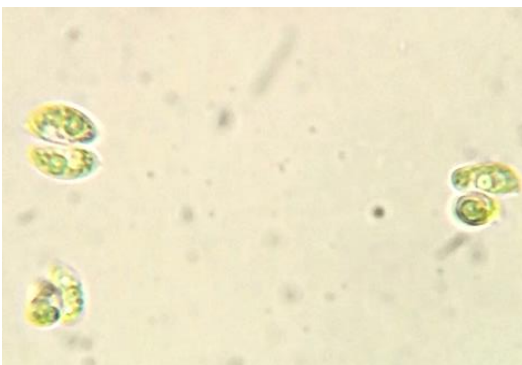
A-22



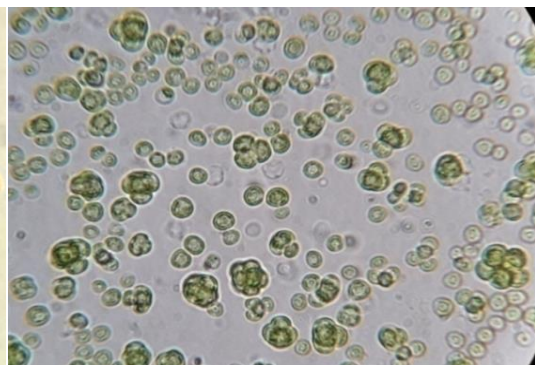
A-23



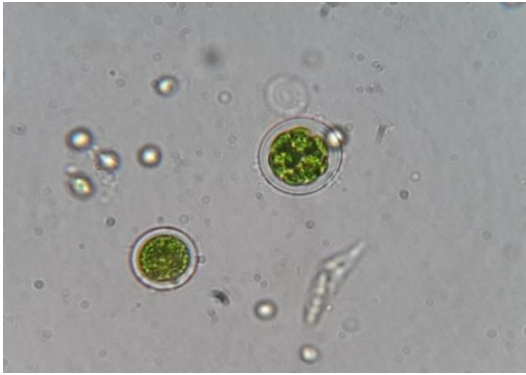
A-24



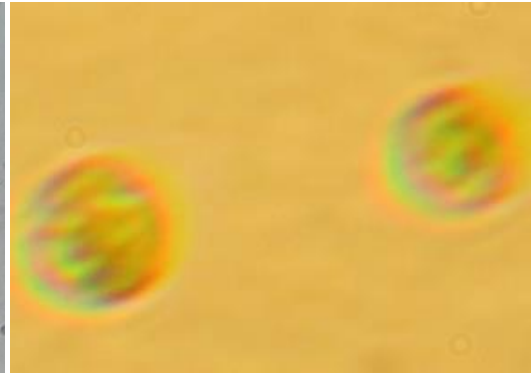
A-25



A-26



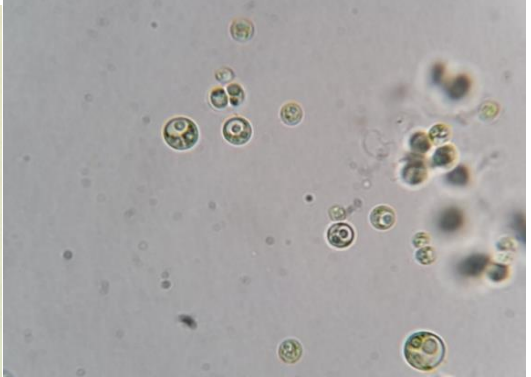
A-27



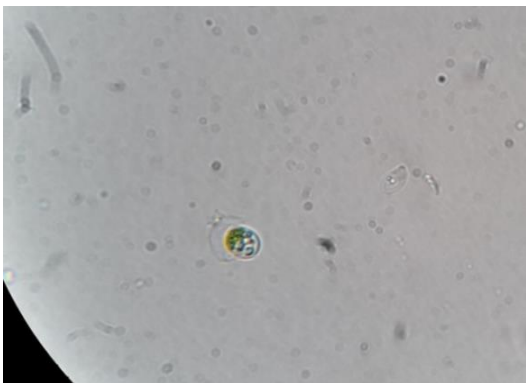
A-28



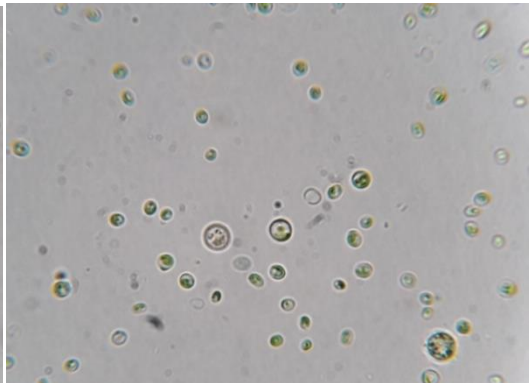
A-29



A-30



A-31

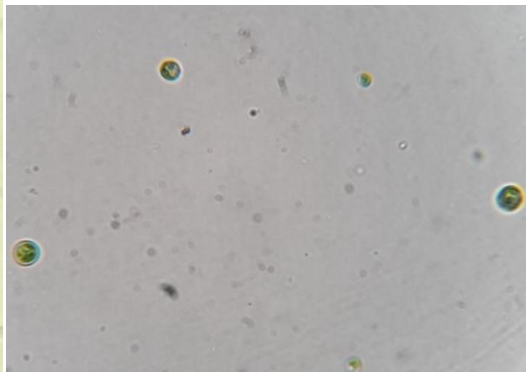


A-32

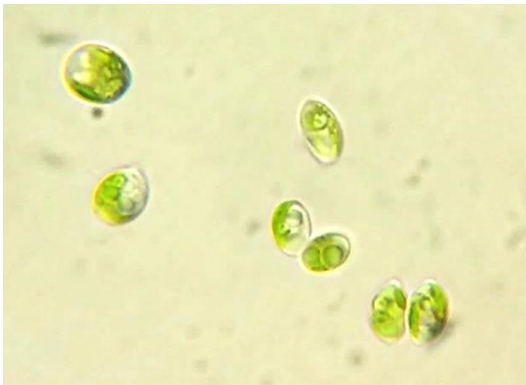




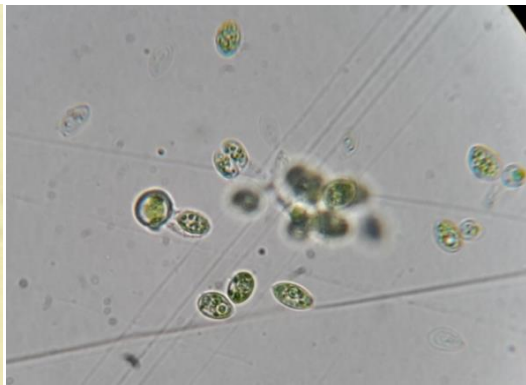
A-33



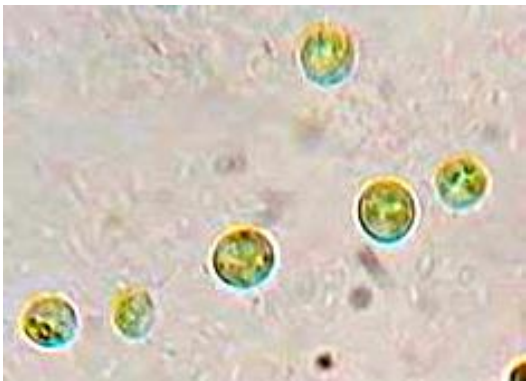
A-34



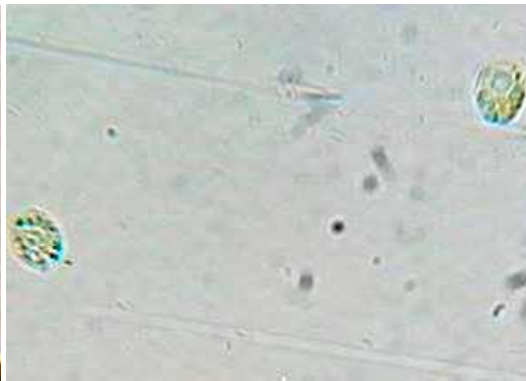
A-35



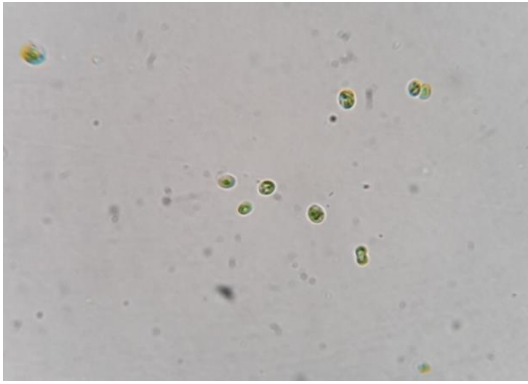
A-36



A-37



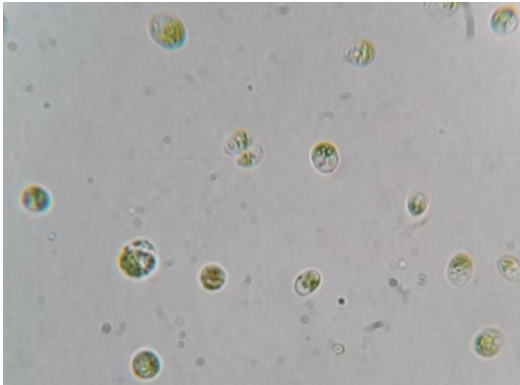
A-38



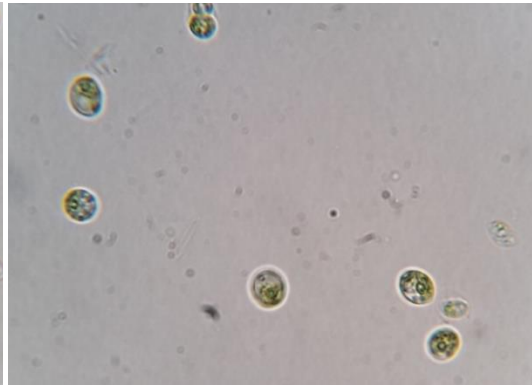
A-39



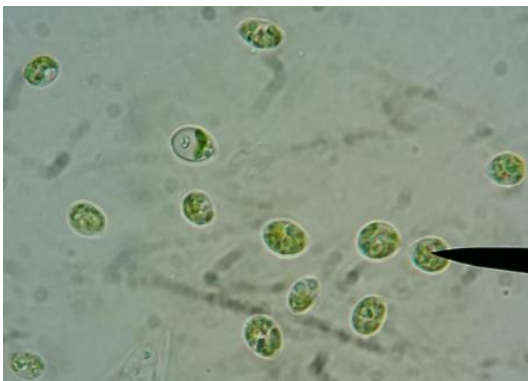
A-40



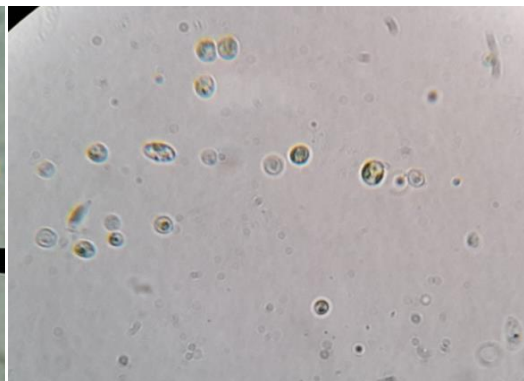
A-41



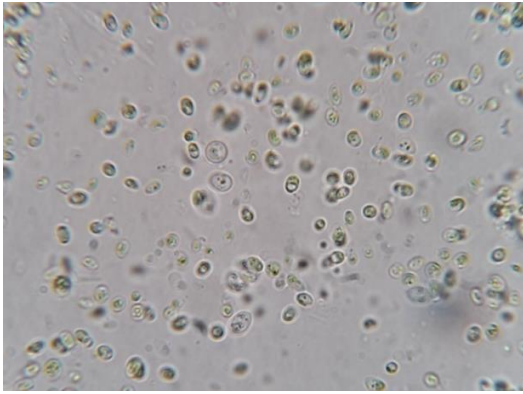
A-42



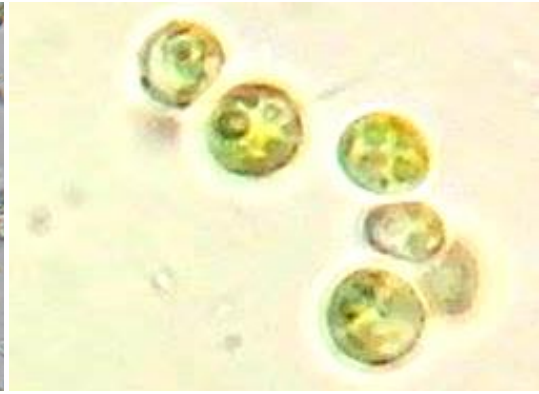
A-43



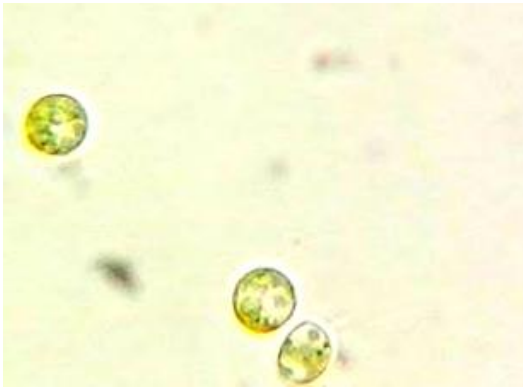
A-44



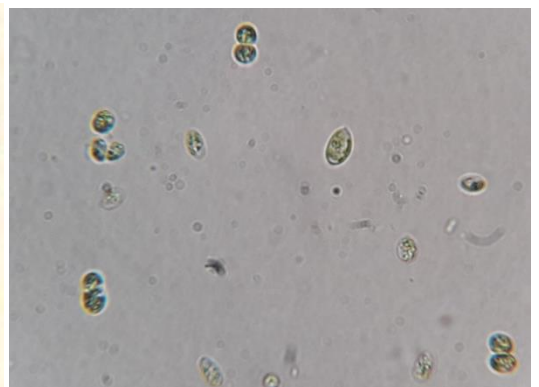
A-45



A-46



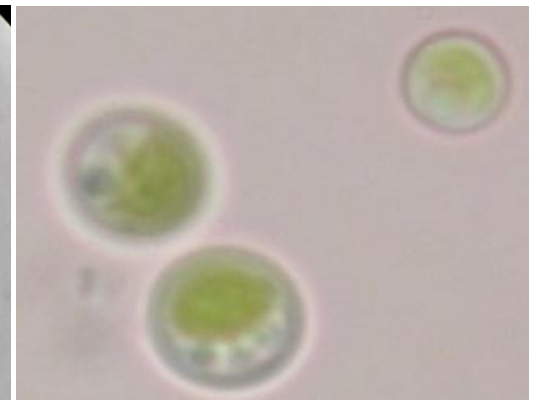
A-47



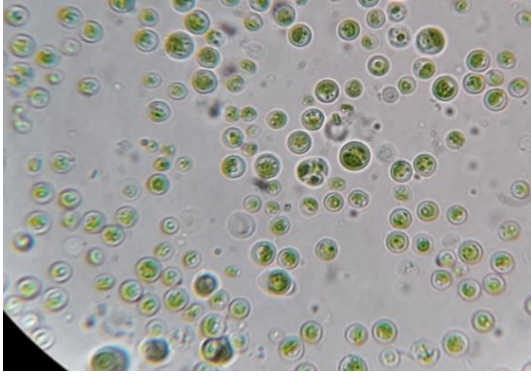
A-48



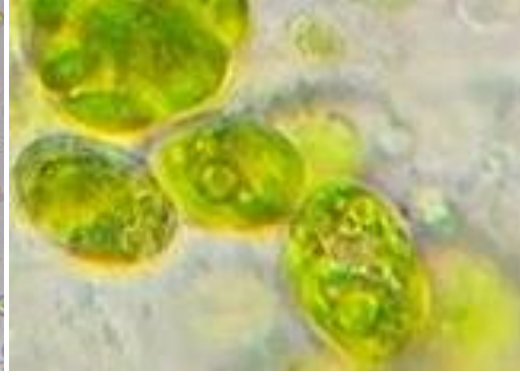
A-49



A-50



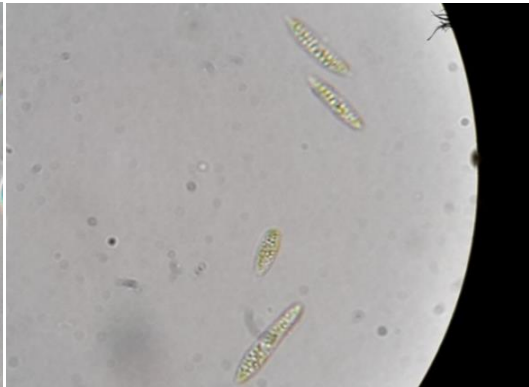
A-51



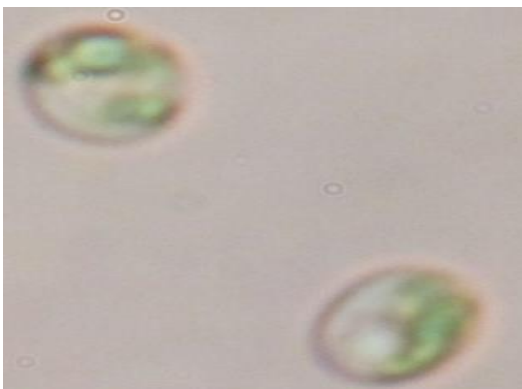
A-52



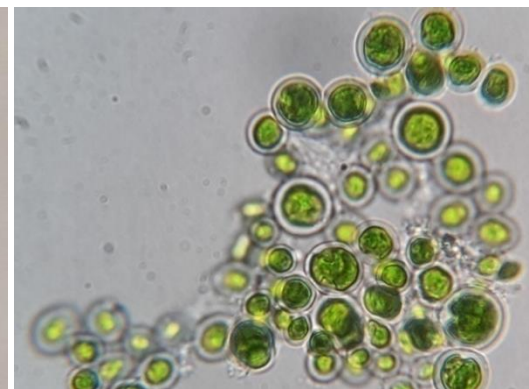
A-53



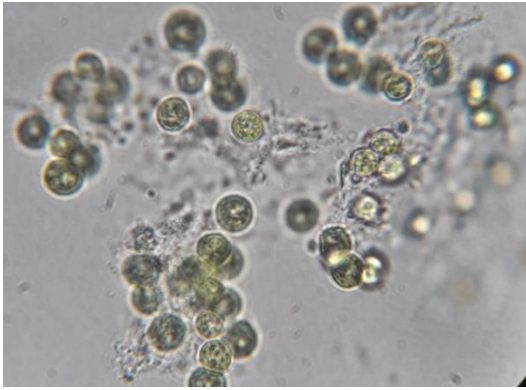
A-54



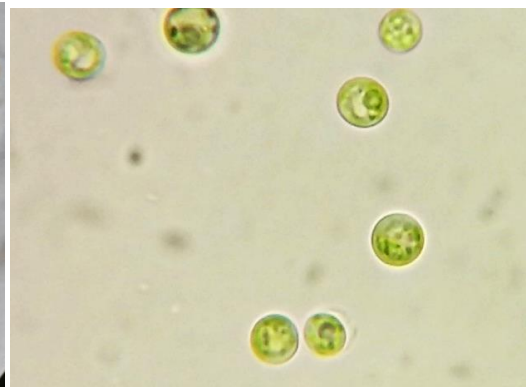
A-55



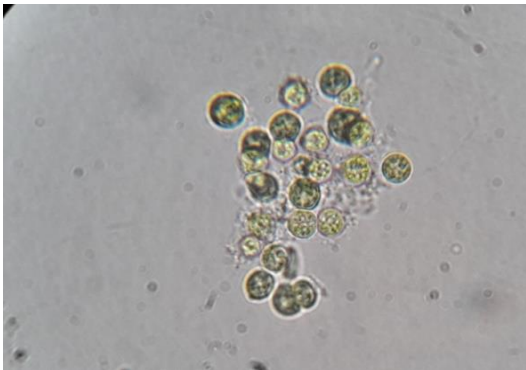
A-56



A-57



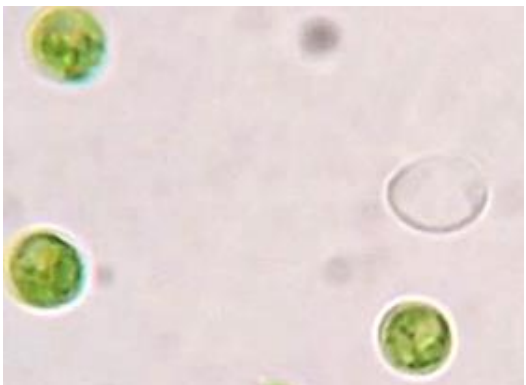
A-58



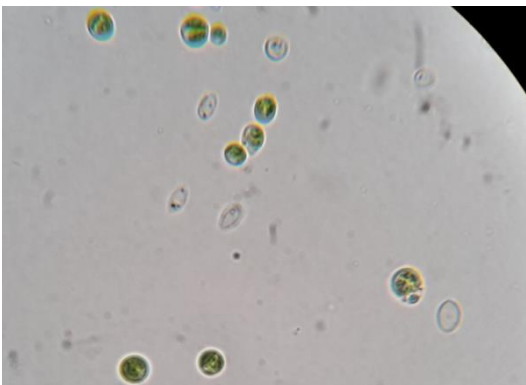
A-59



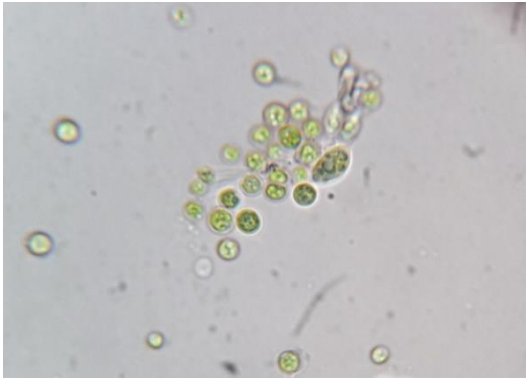
A-60



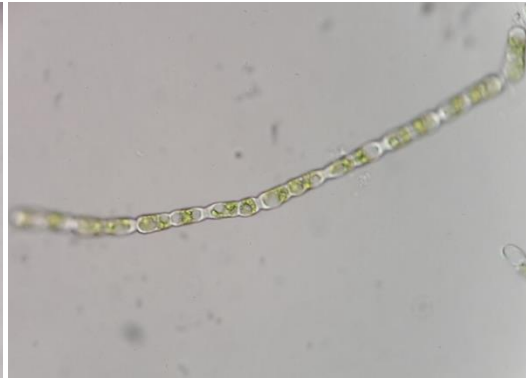
A-61



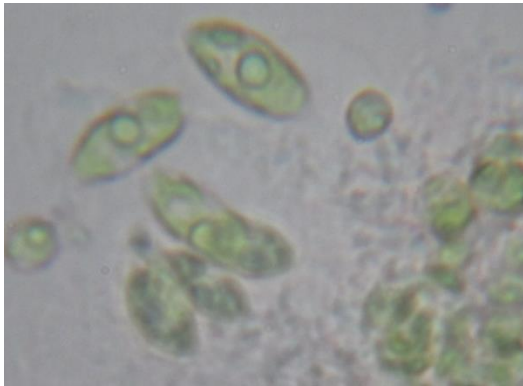
A-62



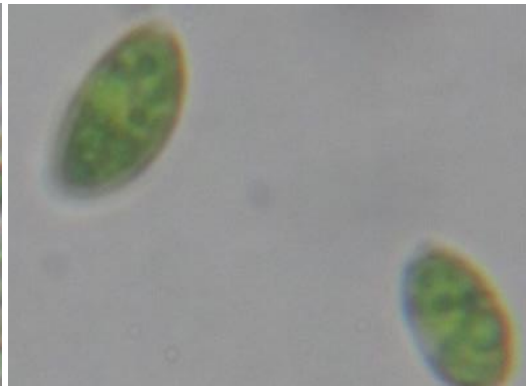
A-63



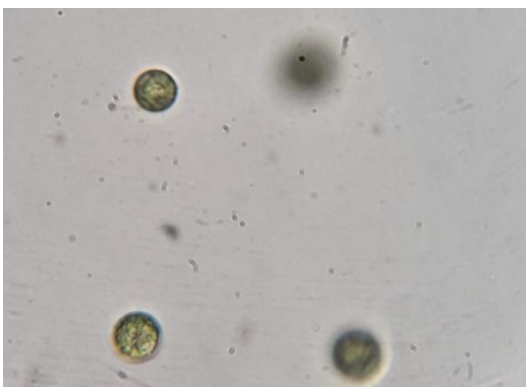
A-64



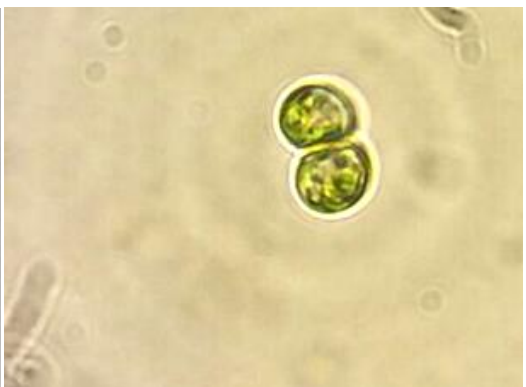
A-65



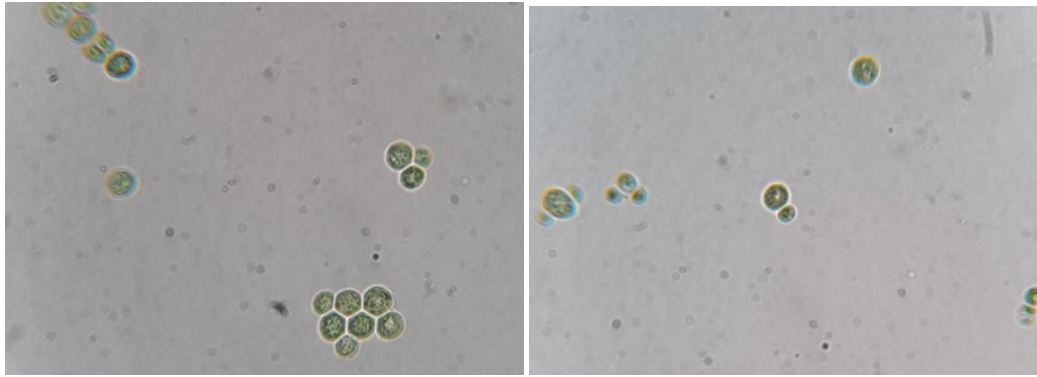
A-66



A-67



*N. oleoabundans*



A-69

A-70

Fig. 12 Fotos de cepas aisladas colectadas en diferentes regiones del estado de Nuevo León y del país, así como la cepa de referencia *N. oleoabundans*.

### 2.3.2.2 Ceparío

Sé estableció un ceparío para mantener los cultivos en condiciones apropiadas y garantizar que las cepas se encuentren en un buen estado, evitando así un colapso de las colecciones de microalgas que provocaría la pérdida de cepas. Todos los matraces con las cepas aisladas de la A-1 a la A-70, fueron incubados en agitación continua en un shaker a 150rpm a 25°C, a una intensidad lumínica de  $32\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  mediante lámparas fluorescentes de luz blanca de 20W, y a un fotoperiodo de luz-oscuridad de 12:12, Los cuales sirvieron como fuente de inóculo para los experimentos diseñados (Fig. 13 y 14); mientras que los cultivos sólidos se mantienen en cajas de petri o en tubos de ensayo de 25-50 ml. conteniendo agar Bristol (Fig. 15). La transferencia de los cultivos se realiza generalmente cada 20-25 días, dependiendo del crecimiento de la cepa; y las inoculaciones se realizaron bajo una atmósfera estéril en una cámara de flujo laminar (Labconco purifier class II).



Fig 13.-Imagen de cepario., para brindar las mejores condiciones de crecimiento a las microalgas aisladas, se utilizó el medio Bristol, compuesto por macronutrientes y elementos traza, a un pH de 6.8 en matraces Erlenmeyer de 250ml.



Fig14.- Imagen de microalgas aisladas, enshakers con luz implementada a 150rpm y temperatura de 25°C, con una intensidad lumínica de  $32\mu\text{mol m}^2 \text{seg}^{-1}$  mediante lámparas fluorescentes de luz blanca de 20W, y a un fotoperiodo de luz-oscuridad de 12:12.



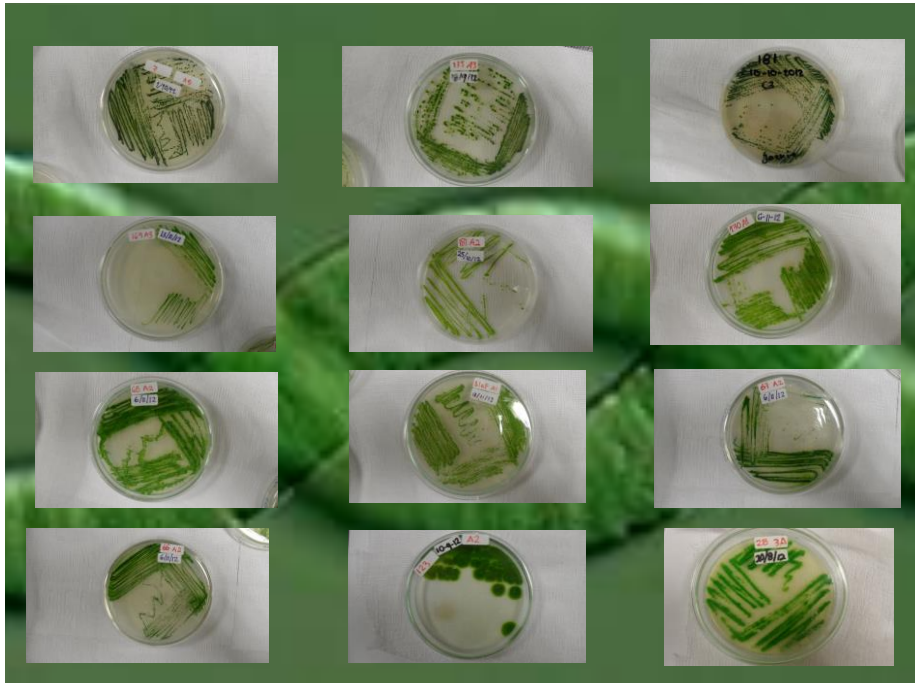


Fig 15.- Cepas aisladas en cultivos sólidos de agar bristol, mantenidas en cajas de petri o en tubos de ensayo de 25-50 ml., a 25°C, con una intensidad lumínica de  $32\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  mediante lámparas fluorescentes de luz blanca de 20W, y a un fotoperiodo de luz-oscuridad de 12:12.

### 2.3.3. Cepas seleccionadas

Para la detección de la presencia de lípidos en las especies de microalgas aisladas, se utilizó el método de tinción con el reactivo sudan IV; al observar las muestras bajo el microscopio, gotas de color rojo eran claramente visibles en las células que contenían una cantidad importante de lípidos. Teniéndose éxito en 23 de las 70 cepas aisladas; siendo éstas:

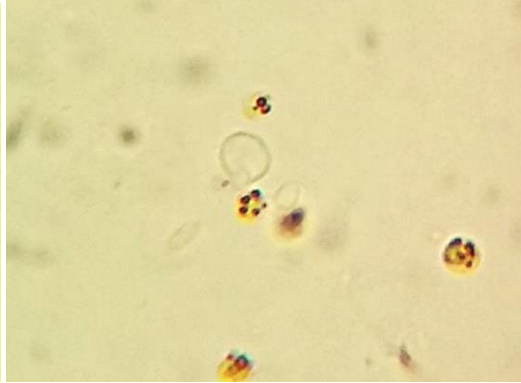
A-1, A-3, A-4, A-9, A-12, A-14, A-18, A-20, A-25, A-29, A-33, A-35, A-37, A-38, A-40, A-43, A-46, A-47, A-52, A-54, A-58, A-61 y A-204 (Fig. 16).

**Cepas sin teñir**

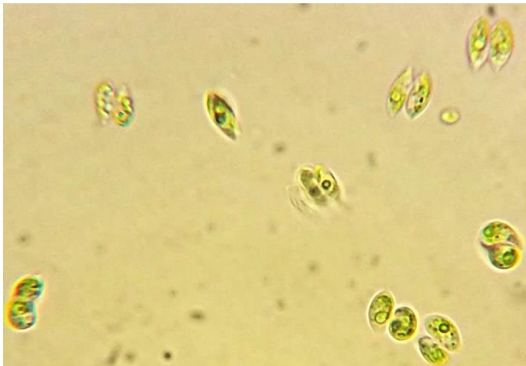


A-1

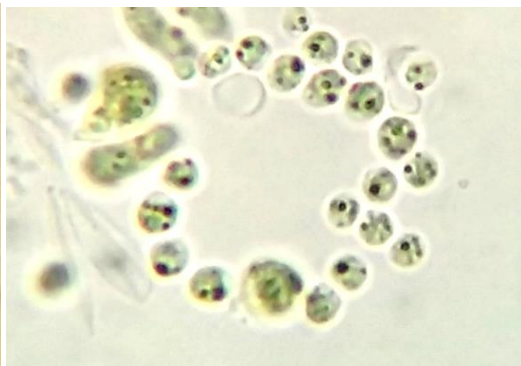
**Cepas Teñidas**



A-1 Teñida



A-3



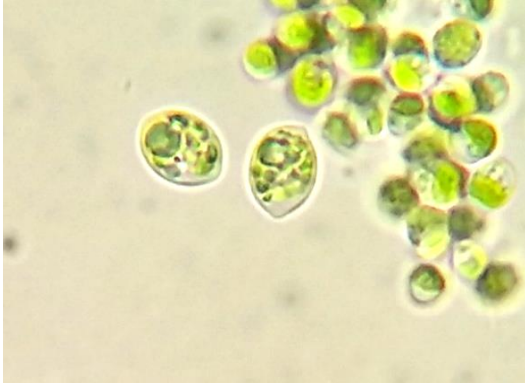
A-3 Teñida



A-4



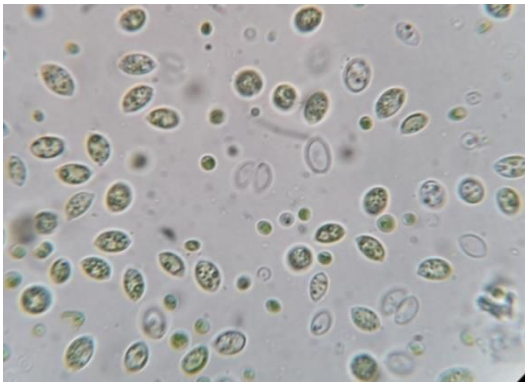
A-4 Teñida



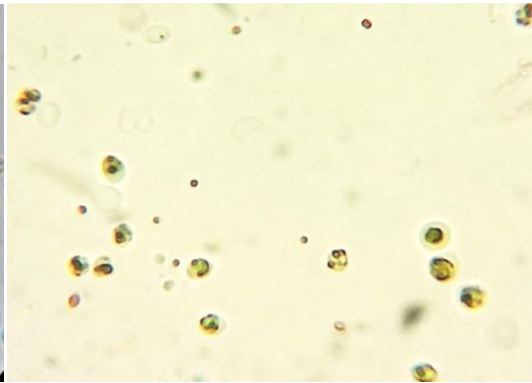
A-9



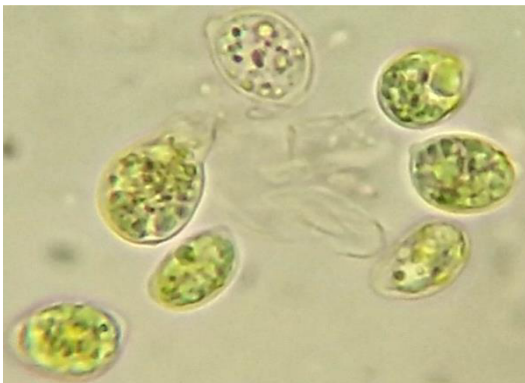
A-9 Teñida



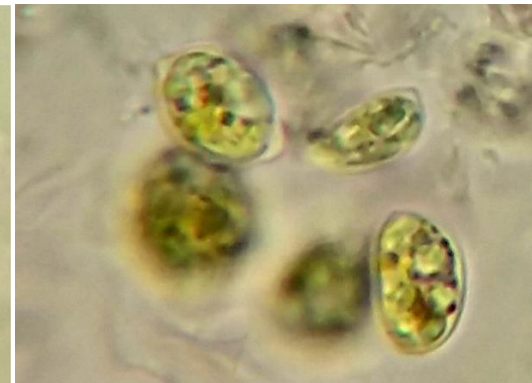
A-12



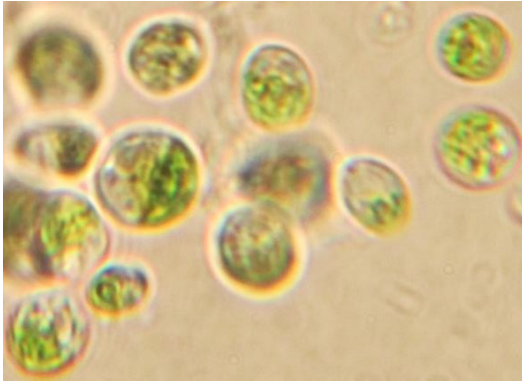
A-12 Teñida



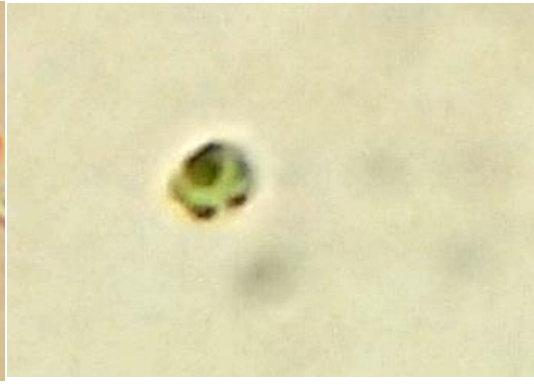
A-14



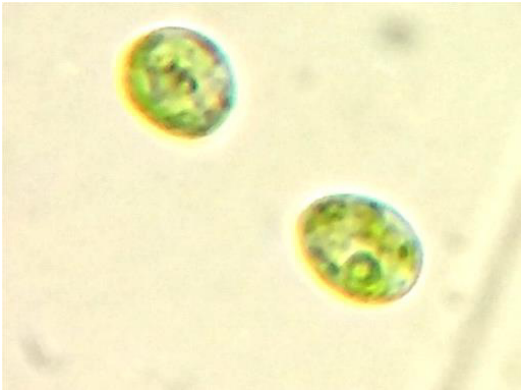
A-14 Teñida



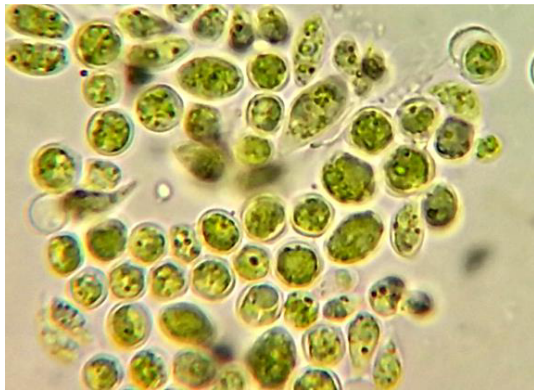
A-18



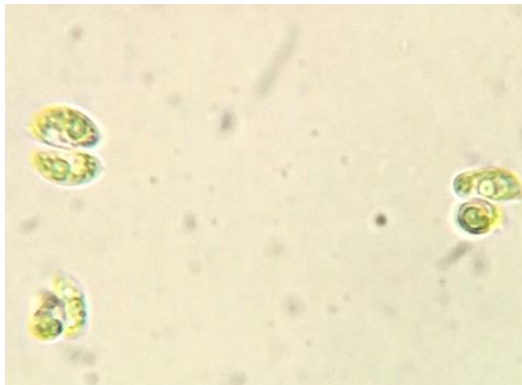
A-18 Teñida



A-20



A-20 Teñida



A-25



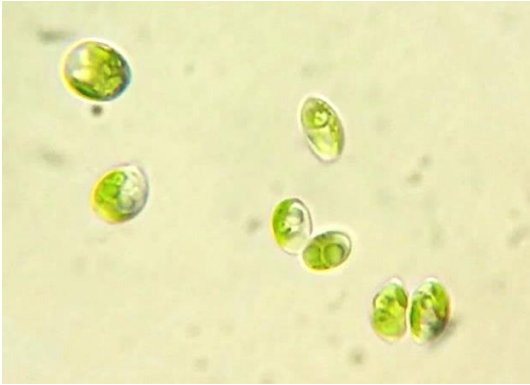
A-25 Teñida



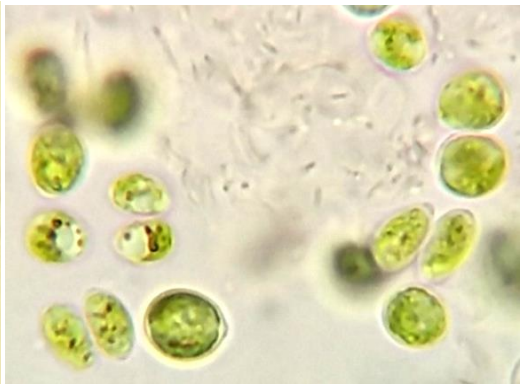
A-29



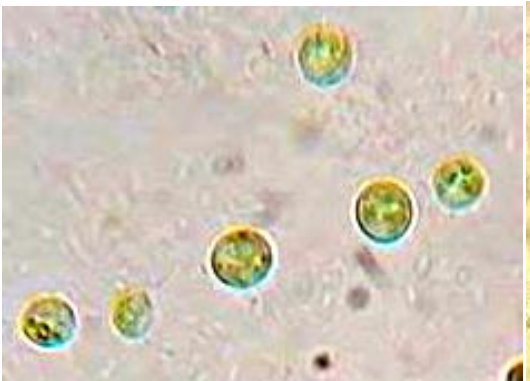
A-29 Teñida



A-35



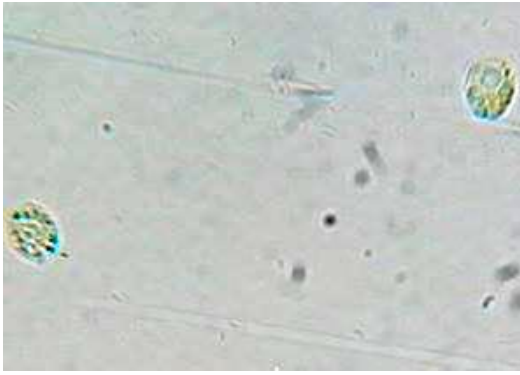
A-35 Teñida



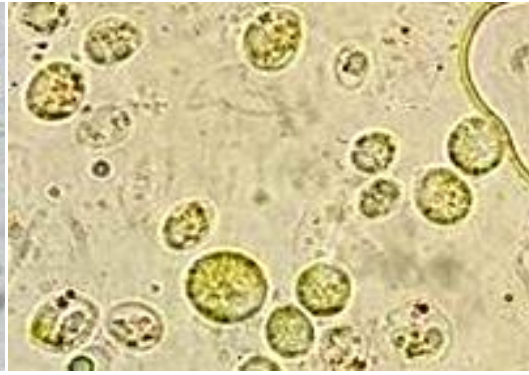
A-37



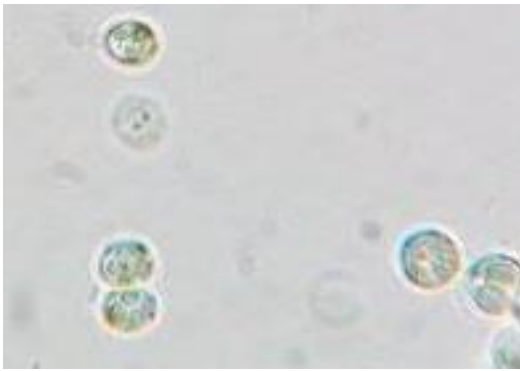
A-37 Teñida



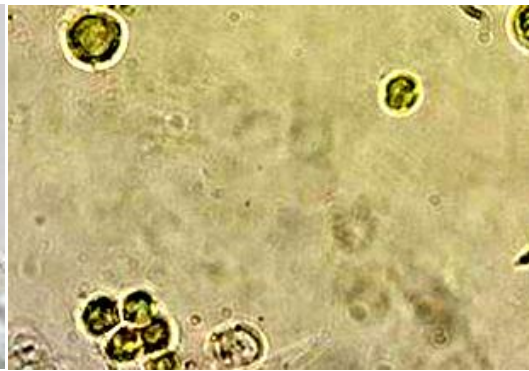
A-38



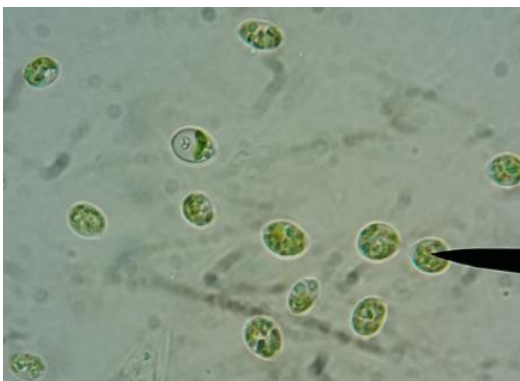
A-38 Teñida



A-40



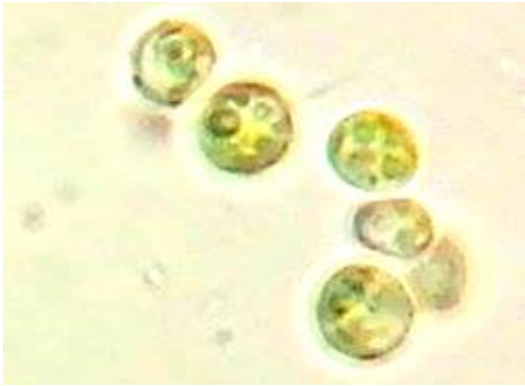
A-40 Teñida



A-43



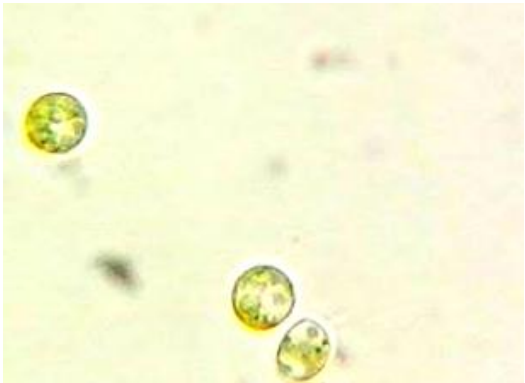
A-43 Teñida



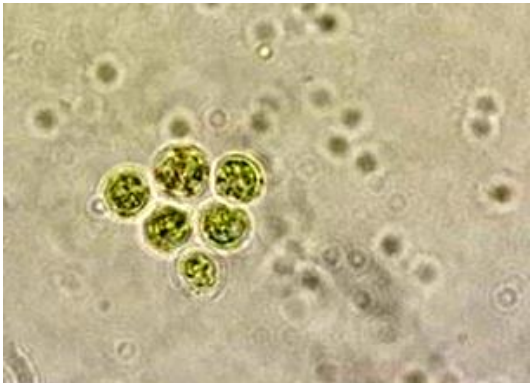
A-46



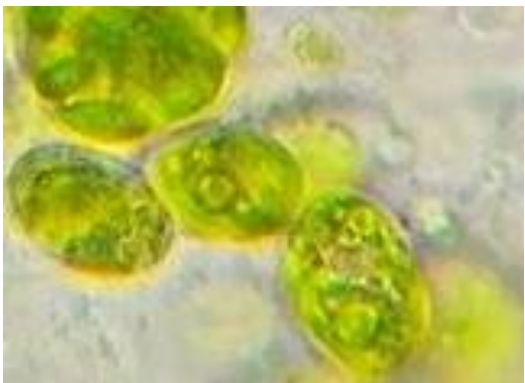
A-46 Teñida



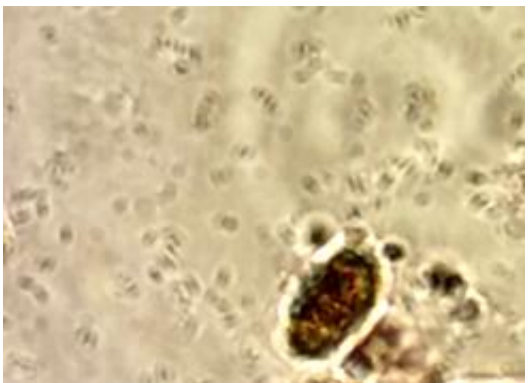
A-47



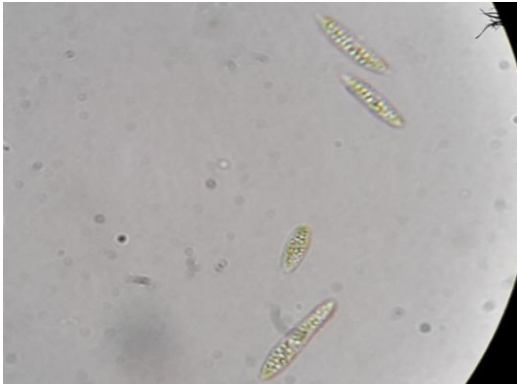
A-47 Teñida



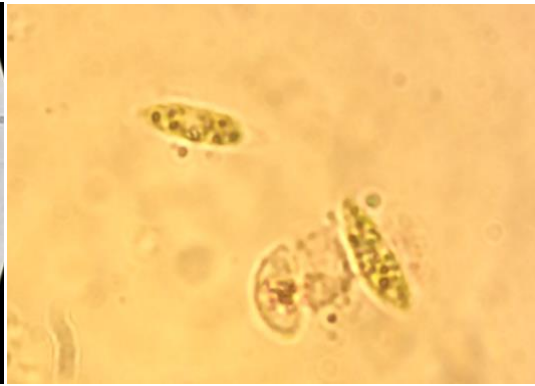
A-52



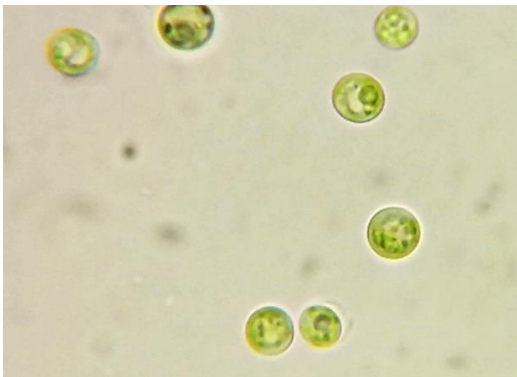
A-52 Teñida



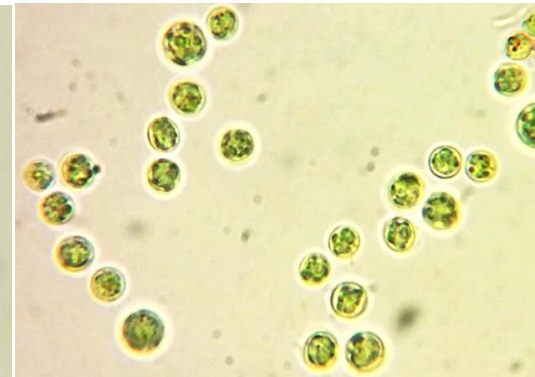
A-54



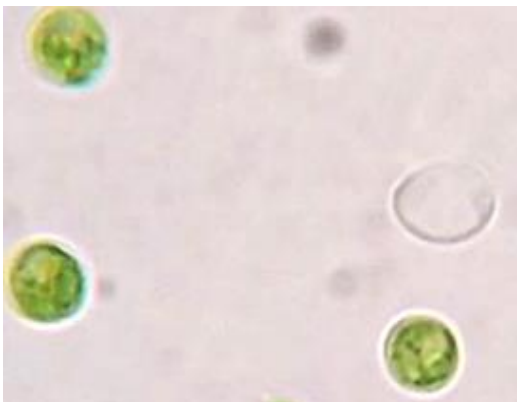
A-54 Teñida



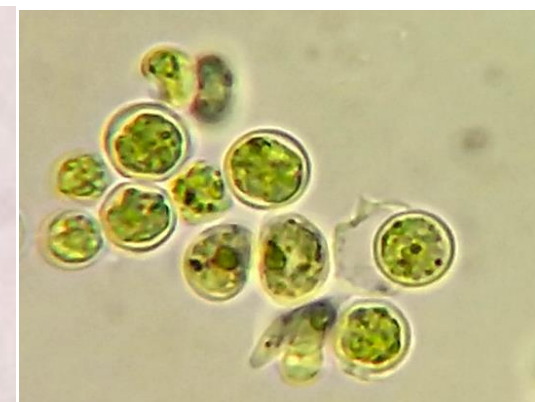
A-58



A-58 Teñida

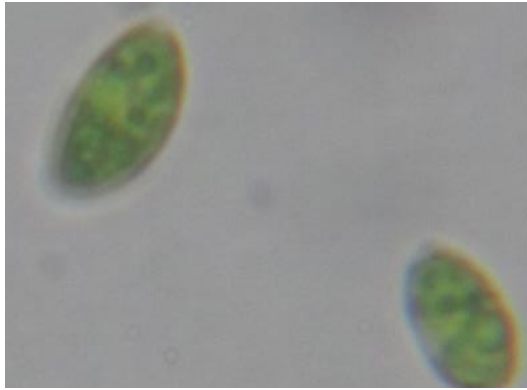


A-61

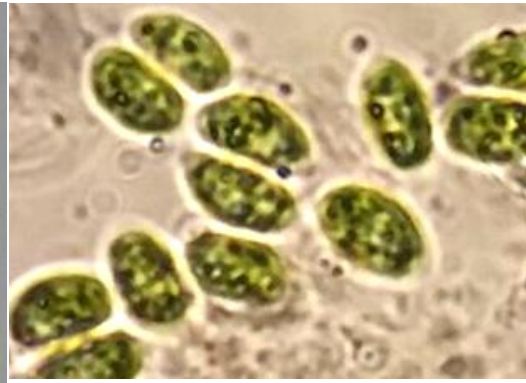


A-61 Teñida

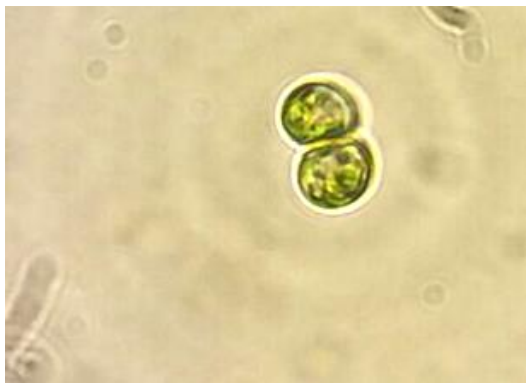




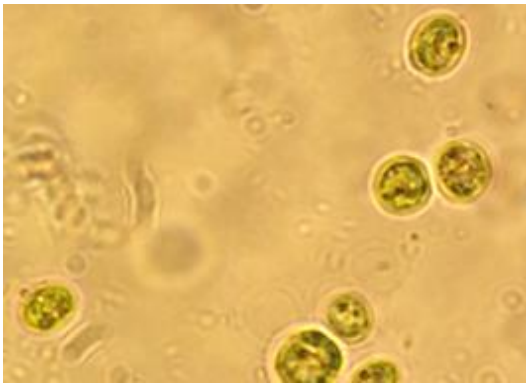
A-66



A-66 Teñida



*N. oleoabundans* UTEX 1185



*N. oleoabundans* UTEX 1185 Teñida

Fig. 16 Detección de la presencia de lípidos en 23 de las 70 cepas aisladas así como en la cepa de referencia *N. oleoabundans*, mediante el método de tinción con el reactivo sudan IV; bajo el microscopio, gotas de color rojo eran claramente visibles en las células que contenían una cantidad importante de lípidos. Fotos de columna izquierda sin teñir – Fotos de columna derecha teñidas.

## 2.4. DISCUSIÓN

### 2.4.1. Aislamiento

El aislamiento y cultivo de microalgas es un laborioso proceso que consume mucho tiempo. Para ahorrar tiempo y costos, la mayoría de los estudios anteriores se aprovecharon de las colecciones de cultivos existentes, disponibles por un costo relativamente bajo; para mejorar los métodos de medición y ensayar diferentes técnicas de extracción de lípidos (Murray y Thomson 1977; Matsumoto et al. 2009; Wang et al. 2010), además de probar cómo la privación de nutrientes y las condiciones de estrés mediante diferentes intensidades de luz, podrían ser empleados para aumentar el contenido de lípidos en las microalgas (Liu et al. 2008; Imamoglu et al. 2009; Mandal y Mallick 2009; Pruvost et al. 2009; Dragone et al. 2011). Sin embargo, se ha reconocido la necesidad de ir más allá de las colecciones de cultivos existentes e iniciar nuevos aislamientos de microalgas que vivan en ambientes específicos.

. El muestreo es enfocado donde el microclima se altera frecuentemente entre un crecimiento en condiciones óptimas y condiciones desfavorables (por ejemplo, con bajos nutrientes, en condiciones de microoxigenación, anaerobiosis, luz alta/baja o climas con fluctuaciones entre secos, fríos o calientes o con cambios rápidos en la salinidad). El muestreo en estos lugares se considera ventajoso debido a que las condiciones subóptimas requeriría que las algas acumularan foto-asimilados tales como almidón o lípidos que tienen una importante función de almacenamiento para sobrevivir, lo que aumenta las posibilidades de obtener cepas con alto contenido de lípidos (Lim et al. 2012).

En base a esto, en este trabajo se procedió a realizar la colecta en zonas, principalmente del estado de Nuevo Leon, el cual reúne éste tipo de características presentando un medio ambiente en donde el microclima se altera frecuentemente, entre un crecimiento en condiciones óptimas y condiciones desfavorables, con muchos cambios, inclusive con diferencia de horas, que van desde climas de calor extremo a bajas temperaturas, de ambientes húmedos a secos, baja cantidad de nutrientes, zonas aridas, luz alta /baja,

presentando temperaturas arriba de los 40°C en verano y de 1-5°C en invierno. Logrando aislar 70 diferentes cepas de microalgas provenientes de este tipo de microambientes, utilizando para este proposito los métodos de estría cruzada en placa (Fig. 2.4), y para microalgas mayores a 10µm de diámetro, el método de aislamiento con pipeta (Andersen y Kawachi 2005) el cual consistió en aislar la microalga con la ayuda de una pipeta Pasteur con punta reducida y/o con un capilar.

El aislamiento es un proceso necesario para obtener cultivos puros y presenta el primer paso hacia la selección de cepas de microalgas con potencial para la producción de biodiesel. Se espera que diferentes especies tengan mejor desempeño en diferentes condiciones acuáticas, geográficas y climáticas (Van Thang et al. 2012).

#### **2.4.2. Cultivo**

A diferencia de muchos cultivos agrícolas, una selección específica y domesticación de cepas de microalgas está todavía en su infancia, mientras que la tecnología para crecer microalgas económicamente con alto contenido de lípidos está todavía en desarrollo (Chisti 2007). Cada cepa de microalgas requiere de una cuidadosa selección y optimización con el fin de aumentar la productividad de lípidos, con el objetivo de proporcionar un sistema de cultivo con propiedades de rendimiento y producción de biocombustible mejorados (Dinh et al. 2009).

Para brindar las mejores condiciones de crecimiento a las microalgas aisladas, se utilizó el medio Bristol, compuesto por macronutrientes y elementos traza, a un pH de 6.8 (Tabla 3). Lográndo ser un medio muy eficiente para el crecimiento y mantenimiento de las 70 cepas aisladas. Asimismo, todos los matraces con las cepas aisladas de la IBL2-1 a la IBL2-70, fueron incubados en agitación continua en un shaker a 150rpm a 25°C, a una intensidad lumínica de 32µmol m<sup>-2</sup> seg<sup>-1</sup> mediante lámparas fluorescentes de luz blanca de 20W, y a un fotoperiodo de luz-oscuridad de 12:12, los cuales sirvieron como fuente de inóculo para los experimentos diseñados.

### **2.4.3. Selección de cepas lipídicas mediante Sudan IV**

Un punto crítico para el inicio de este proceso es la identificación de cepas de algas que posean cantidades de lípidos totales en general y lípidos neutros en particular, y que sean capaces de acumulación rápida bajo diversas condiciones. Dentro de la identificación de especies de algas deseables, un paso crucial es el “screening” de contenido lipídico. Una manera de detectar e identificar especies de algas que contienen aceite de forma rápida, es mediante la utilización del reactivo Sudan IV (Umarah 2011).

En base a lo anterior, para la detección de la presencia de lípidos en las diferentes especies de microalgas aisladas, se utilizó el método de tinción con el reactivo sudan IV, el cual se realizó con éxito, lográndose detectar un total de 23 cepas con una importante presencia de lípidos dentro de su célula, las cuales fueron seleccionadas para los posteriores experimentos.

### **2.4.4. Establecimiento de cepario**

Para ahorrar tiempo y costos, la mayoría de los estudios anteriores se aprovecharon de las colecciones de cultivos existentes, disponibles por un costo relativamente bajo; para mejorar los métodos de medición de lípidos, probar diferentes técnicas de extracción de lípidos (Murray y Thomson 1977; Matsumoto et al. 2009; Wang et al. 2010), estudiar cómo el flujo de gas puede ser utilizado para estimular el crecimiento (Sheehan et al. 1998), y cómo la privación de nutrientes y las condiciones de estrés mediante diferentes intensidades de luz, podrían ser empleados para aumentar el contenido de lípidos en las microalgas (Liu et al. 2008; Imamoglu et al. 2009; Mandal y Mallick 2009; Pruvost et al. 2009; Dragone et al. 2011).

Una vez que se logró seleccionar cepas con presencia de lípidos dentro de su célula, el siguiente paso importante fue el de establecer un cepario para poder llevar a cabo diferentes tipos de investigaciones, tanto para este trabajo, como para cualquier otra investigación que requiera el uso de microalgas.

Finalmente, se establecieron condiciones de mantenimiento básicas para la mayoría de las especies aisladas, sin embargo en ocasiones fue necesario llevar a cabo modificaciones, que dependían de los requerimientos de la especie de interés.

## 2.5. CONCLUSIÓN

Se lograron aislar 70 diferentes cepas de microalgas provenientes de microambientes que presentaban condiciones desde climas de calor extremo a bajas temperaturas, de ambientes húmedos a secos, baja cantidad de nutrientes, zonas áridas, luz alta /baja, presentando temperaturas arriba de los 40°C en verano y de 1-5°C en invierno. Asimismo, cada cepa de microalgas requirió de una cuidadosa selección y optimización del medio de cultivo con el fin de mantener y aumentar la productividad de lípidos, utilizándose el medio Bristol, compuesto por macronutrientes y elementos traza, a un pH de 6.8

Posteriormente se realizó la detección de la presencia de lípidos en las diferentes especies de microalgas aisladas, utilizando el método de tinción con el reactivo Sudan IV, el cual se realizó con éxito, lográndose detectar un total de 23 cepas con una importante presencia de lípidos dentro de su célula, las cuales fueron seleccionadas para los posteriores experimentos.

Una vez que se logró seleccionar cepas con presencia de lípidos dentro de su célula, el siguiente paso realizado fue el de establecer un cepario para poder llevar a cabo diferentes tipos de investigaciones, tanto para este trabajo, como para cualquier otra investigación que requiera el uso de microalgas.

Finalmente, se establecieron condiciones de mantenimiento básicas para la mayoría de las especies aisladas, sin embargo en ocasiones fue necesario llevar a cabo modificaciones, que dependían de los requerimientos de la especie de interés.

# **DISEÑO DE FOTOBIORREACTOR, OPTIMIZACIÓN DE CRECIMIENTO Y DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS NEUTROS MEDIANTE LA SONDA FLUORESCENTE ROJO NILO EN CEPAS SELECCIONADAS SIN ESTRÉS**

### **3.1 INTRODUCCIÓN**

La producción masiva de biomasa microalgal sin duda tiene un costo económico mayor que la producción de otros recursos vegetales para producir biocombustibles (Chisti 2007). Principalmente el cultivo de microalgas ha sido llevado a cabo bajo dos tipos de sistemas de cultivo: sistemas abiertos o tanques de cultivo y sistemas cerrados o fotobiorreactores (Jorquera et al. 2010; Harun et al. 2010). Alrededor del 90% de la producción comercial mundial de microalgas se hace a través de sistemas abiertos, debido al bajo costo (Van Beilen 2010). Sin embargo, los sistemas abiertos son menos favorables por proporcionar poco control frente a la contaminación por polvo, microorganismos (Tredici 2004).

Los sistemas cerrados o fotobiorreactores, generalmente son tubos o placas planas en los cuales pueden ser controlados parámetros como nutrientes, temperatura, CO<sub>2</sub> disuelto y pH (Chen et al. 2009), siendo en este sentido, la ventaja comparativa frente a los sistemas abiertos. A pesar de que los fotobioreactores son más caros que los sistemas abiertos, son capaces de tener una mayor productividad por área de cultivo (Chisti 2007).

Existen diferentes tipos de fotobiorreactores, por ejemplo tubular horizontal, panel delgado, tanque agitado, columna de burbujas, plato delgado, tubular inclinado y Air lift (Carvalho et al. 2006). Debido a que un buen mezclado puede aumentar la productividad hasta 40% en un fotobiorreactor tubular (Ugwu et al. 2002), una buena opción sería el sistema de mezcla de gases como el empleado en el sistema Air lift, ya que causa menos impacto que los de sistema mecánico, que pueden causar daños a la

biomasa (Sánchez et al. 2003; Chisti 1999; Mazzuca et al. 2006). Mientras que en el sistema Air lift, la mezcla se alcanza por flujo de fluidos por burbujeo de aire dentro de un tubo central de ascenso, que luego se distribuye bajando por la parte exterior del tubo central, creando una circulación natural (Chisti y Jauregui-Haza 2002). Para un crecimiento óptimo, el cultivo de microalgas requiere condiciones ambientales específicas, incluyendo los rangos de temperatura, intensidad de la luz, condiciones de mezclado, composición de nutrientes e intercambio de gases, ya que las diferentes especies tienen distintos requerimientos.

En este sentido, además de los parámetros anteriores se debe tomar en cuenta el diseño del fotobiorreactor, procurando que todas las células tengan la misma exposición a la luz, además de suministrar una relación área superficie/volumen (S/V) grande, que ocupe menos espacio terrestre, rápida transferencia de masa y que logre una mayor productividad (Janssen et al. 2000)

El proceso de aislamiento y selección de cepas, debe tener en cuenta los requerimientos de aceite adecuado para la producción de biodiesel. Los lípidos de algas se producen predominantemente en las células, ya sea como lípidos polares (principalmente en membranas), o cuerpos lipídicos, típicamente en forma de triacilglicéridos (Van Thang et al. 2012).

Actualmente, el contenido intracelular de lípidos de microalgas se puede medir usando varios métodos, incluyendo gravimetría, espectrofluorometría, y cromatografía. Sin embargo, el método gravimétrico requiere extracción por solventes, es demasiado laborioso, y consume mucho tiempo, mientras que la cromatografía necesita suficiente cantidad de muestra para derivatizar los ácidos grasos (Chen et al. 2011).

Comparada con los métodos tradicionales, los cuales toman de 3-4 días y necesitan al menos 10-15 mg de muestra, la medición de fluorescencia con Rojo Nilo es simple, rápida y sensible (Huang et al. 2009)

El método de fluorescencia con Rojo Nilo es una técnica que se ha venido utilizando para la determinación de lípidos intracelulares y es considerada como una herramienta útil para la cuantificación de lípidos en microalgas. El rojo Nilo (9-diethylamino-5H-



benzo [ $\alpha$ ]phenoxazine-5-one. Sigma–Aldrich)( $C_{20}H_{18}N_2O_2$ , MW: 318.37; SC biotechnology, Cat. No. 203747A), es un colorante fotoestable, intensamente fluorescente en solventes orgánicos y ambientes hidrofóbicos, pero tiene baja intensidad en agua (Elsey et al. 2007). La máxima emisión del Rojo Nilo es de una menor longitud de onda (desplazamiento al azul) cuando el medio es menos polar, lo que permite diferenciar entre lípidos polares y neutros de acuerdo a la emisión de las longitudes de onda. La longitud de onda emitida por lípidos polares y neutros usando la técnica de tinción Rojo Nilo es de 610 nm y 580 nm, respectivamente (Chen et al. 2011).

El Rojo Nilo entra a todas las estructuras dentro de la célula, pero el color amarillo-oro fluorescente sólo se manifiesta cuando el colorante penetra en los glóbulos de lípidos neutros intracelulares. Cooksey et al. (1987) demostró una correlación lineal entre la fluorescencia del Rojo Nilo y el contenido total de lípidos neutros de las microalgas. Una de las más grandes ventajas que presenta esta técnica es que las células teñidas con Rojo Nilo siguen siendo viables, lo que hace la técnica útil para la selección de células que se están reproduciendo activamente (Doan y Obbard 2011).

## 3.2. METODOLOGÍA

### 3.2.1. Diseño de Fotobiorreactor

Se diseñó un fotobiorreactor tipo Air lift utilizando vidrio como material de construcción, con una altura de 26cm y un diámetro de 13cm, con una capacidad de 2.3 litros y conteniendo 2 cristales separadores en su interior con 14cm de alto por 11.5 cm de ancho, con una separación de 4cm entre ellos y a una distancia de 4 cm de las paredes del fotobiorreactor, los cuales inducen la recirculación del medio de cultivo y de las microalgas hacia las paredes del fotobiorreactor, asegurándose así que las células reciban energía lumínica a través de las fuentes de luz, colocadas a los 2 extremos. En la parte superior del fotobiorreactor (tapa) se integraron 2 mangueras, diseñadas para la toma de muestra e intercambio de gases, mientras que en el fondo y al centro (a 6.5cm de las paredes) lleva un dispersor de flujo de aire con forma cilíndrica de 3cm de alto y 1.5cm de diámetro

### 3.2.2. Optimización de crecimiento (Determinación de tasa de crecimiento)

Las cepas de microalgas seleccionadas fueron puestas en crecimiento en un fotobiorreactor air lift con una capacidad de 2.3 lts., con burbujeo continuo (flujo de volumen de aire 9.4 L/h) en medio bristol. Los parámetros de cultivo para la optimización del crecimiento a probar fueron: temperatura (25 y 32°C), intensidad lumínica (90,445 y 490  $\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ), concentración de nitrato  $\text{NaNO}_3$  (1.47, 2.94 y 14.71mMol), concentración de fosfato  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.642, 1.28 y 6.42mMol) y las combinaciones de esas variables. A fin de lograrlos parámetros de crecimiento óptimos, se calculó una tasa de crecimiento específico para cada parámetro. Los cultivos fueron iluminados en ciclos de luz-oscuridad en el rango de 12:12 con lámparas fluorescentes (Tecno Lite T4 20W/65) por 26 días. Cada cultivo creció a una tasa de crecimiento en particular. La mayor tasa de crecimiento determinó la cantidad óptima de ese parámetro en particular.

El crecimiento se evaluó con el tiempo por conteo directo de células al microscopio (Leica CME, New York Microscope Company, Inc., USA) mediante la utilización de un Hemocitómetro (Neubauer, Pennsylvania USA) (Fig. 17). Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado.

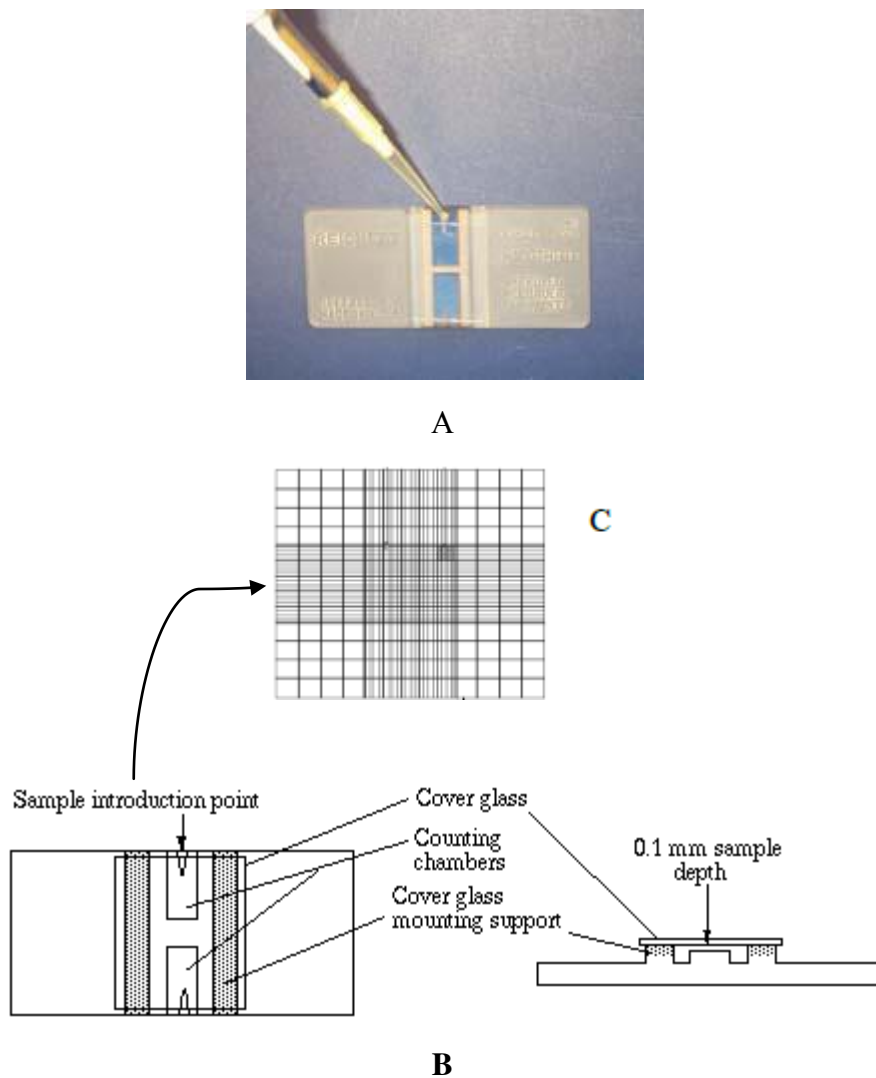


Figure 17. Hemocitómetro: A) Transferencia de una pequeña cantidad de cultivo con ayuda de una pipeta B) Componentes C) Cámaras de recuento.

### **3.2.3. Medición de lípidos neutros (método fluorumétrico)**

Sé determinó la cantidad de lípidos neutros mediante la sonda fluorescente Rojo Nilo, en todas las cepas previamente seleccionadas con el colorante Sudan IV. Primeramente se llevaron a cabo las pruebas de control (+) agregando 3µl de Rojo nilo + 1.2ml de agua desionizada y 1µl de estándar lipids (F.A.M.E. Mix C8-C24 SUPELCO Analytical, Cat. No. 18918 Bellefonte, PA USA) y control (-) adicionando 1.2ml de agua desionizada + 3µl de Rojo Nilo. Además se llevaron a cabo los blancos de cada una de las cepas agregando 1.2ml de muestra de microalgas ajustada a una OD de 0.25 sin agregar la sonda (Rojo Nilo) ni agua desionizada.

Posteriormente para realizar las medidas de intensidad de fluorescencia en las cepas fue necesario ajustar el cultivo de microalgas a una densidad óptica de 0.25 para posteriormente colocar 1.2ml de cada una de las muestras y añadir 3µl de una solución estándar de Rojo nilo (9-dietilamino-5H-benzo [α] fenoxazina-5-uno. Sigma–Aldrich) ( $C_{20}H_{18}N_2O_2$ , MW: 318.37; SC biotechnology, Cat. No. 203747A), es 0.25mg/ml diluido en acetona al 50%.

Las suspensiones se analizaron en un espectrofluorómetro (Perkin-Elmer LS-45) utilizando una cubeta de 0.2cm de paso óptico, y se aplicaron las siguientes condiciones: anchura de la rendija de excitación: 10nm, anchura de la rendija de emisión: 10nm, los espectros fueron registrados desde 500nm hasta 750nm con una velocidad de barrido de 1nm/sec empleando una longitud de onda de excitación de 490nm. La intensidad relativa de fluorescencia se logró después de la sustracción de autofluorescencia del alga y la auto-fluorescencia del Rojo Nilo.

Todas las medidas se hicieron por triplicado en experimentos independientes.

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Fotobiorreactor

Sé diseñó un fotobiorreactor tipo Air lift utilizando vidrio como material de construcción, con una altura de 26cm y un diámetro de 13cm con una capacidad de 2.3 litros (Fig. 18) Conteniendo 2 cristales separadores en su interior con 14cm de alto por 11.5 cm de ancho, teniendo una separación de 4cm entre ellos y a una distancia de 4 cm de las paredes del fotobiorreactor, los cuales inducen la recirculación del medio de cultivo provocado por el flujo de burbujas que emergen del dispersor (Fig. 19A). Causando que las microalgas migren hacia las paredes del fotobiorreactor, asegurándose así que las células reciban energía lumínica a través de las fuentes de luz, colocadas a los 2 extremos (Fig. 19B).



Fig 18 .- Prototipo de fotobiorreactor tipo Air lift



Fig 19.- A).- Recirculación del medio de cultivo debido al flujo de burbujas que emergen del dispersor en un Fotobiorreactor Air lift B).- Migración de las microalgas hacia la Zona fótica del fotobiorreactor debido al flujo.

### 3.3.2. Crecimiento Celular.

#### 3.3.2.1. Efecto del nivel de luz sobre el crecimiento celular a una concentración de $\text{NaNO}_3$ 2.94mM y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.29mM a 25°C

Se midió el efecto del nivel de luz sobre el crecimiento celular en las distintas cepas de microalgas (A1, A3, A4, A12, A14, A18, A20, A25, A29, A33, A35, A37, A38, A40, A43, A46, A47, A52, A54, A58 y A61) a una intensidad de  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a 25°C. Asimismo las cepas A35, A43 y A46 se pusieron adicionalmente a intensidades lumínicas de 90 y  $490 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a 25°C para su evaluación.

Teniendo primeramente como resultado que las cepas A-12, A-14 y A-20 a  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a 25°C mostraron un crecimiento máximo de 28, 13.5 y 16.7 millones de células por mililitro respectivamente, presentandolas cepas A12 y A20 su más alto crecimiento hasta los 22 días. Mientras que la cepa A14 tuvo su máximo crecimiento a los 20 días. Siendo la cepa A12 la que mejor crecimiento mostró de las 3 con 28 millones de cel/ml (Fig. 20). Cabe destacar que la cepa A12 fue la única cepa que en ninguna etapa del

crecimiento formó un biofilm para adherirse a las paredes del fotobiorreactor (Fig. 21). Siendo esta una característica única y muy importante ya que esta cepa podría utilizarse en todo tipo de fotobiorreactores complejos, paneles y de diseño arquitectónico futurista debido a su facilidad de extracción sin dejar residuos en el sistema de producción (Fig. 22).

Por otro lado las cepas A1, A3, A18 y A35 a la misma intensidad de  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ . Se tuvo como resultado un máximo crecimiento de 6, 4, 8.5 y 5.3 millones de células por mililitro respectivamente, presentando las cepas A1 y A35 su más alto crecimiento hasta los 22 días, mientras que la cepa A18 presentó su máximo crecimiento a los 20 días, Cabe destacar que la cepa A3 generó su más alto crecimiento a los 14 días. Por otro lado la cepa A18 fué la que mejor crecimiento mostró de las 4 con 8.5 millones de cel/ml (Fig. 23); sin embargo su crecimiento fue menor al presentado por las cepas A12, A14 y A20 presentadas en la figura 10.

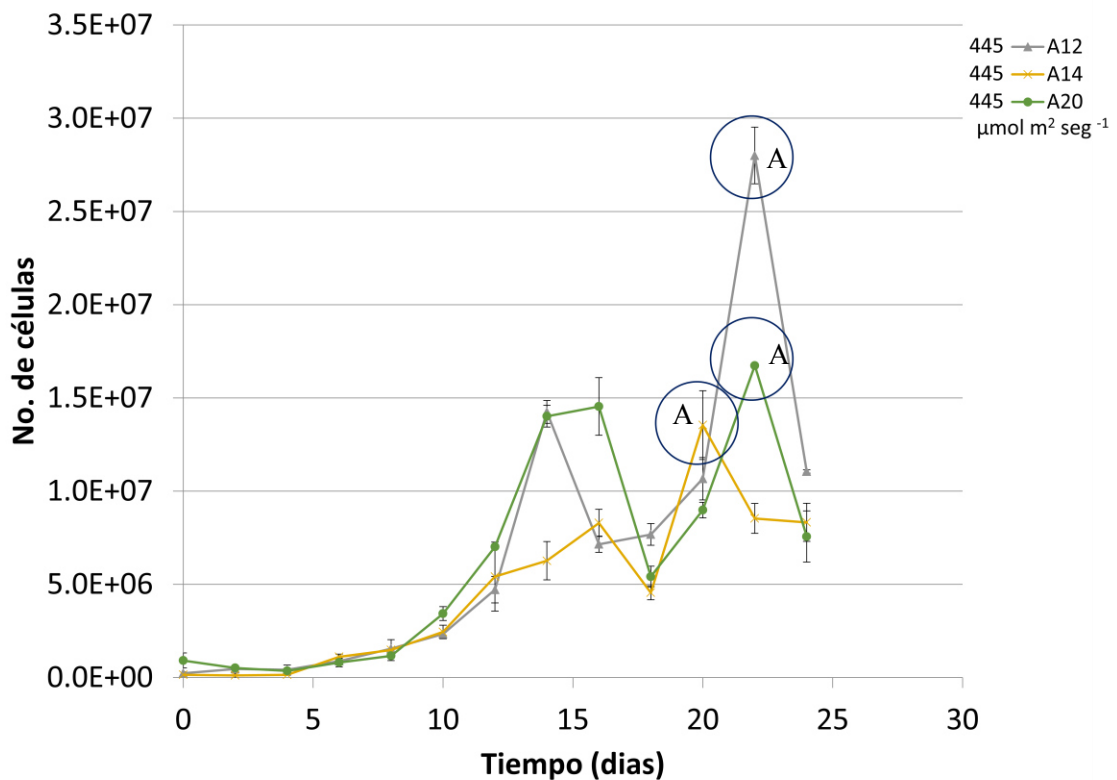


Figura 20. Efecto del nivel de luz sobre el crecimiento celular de las Cepas A12, A14 y A20 a  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ . En el análisis estadístico realizado con nivel de significancia 0.05 y valor de Tukey 3.7118 no muestra una diferencia significativa

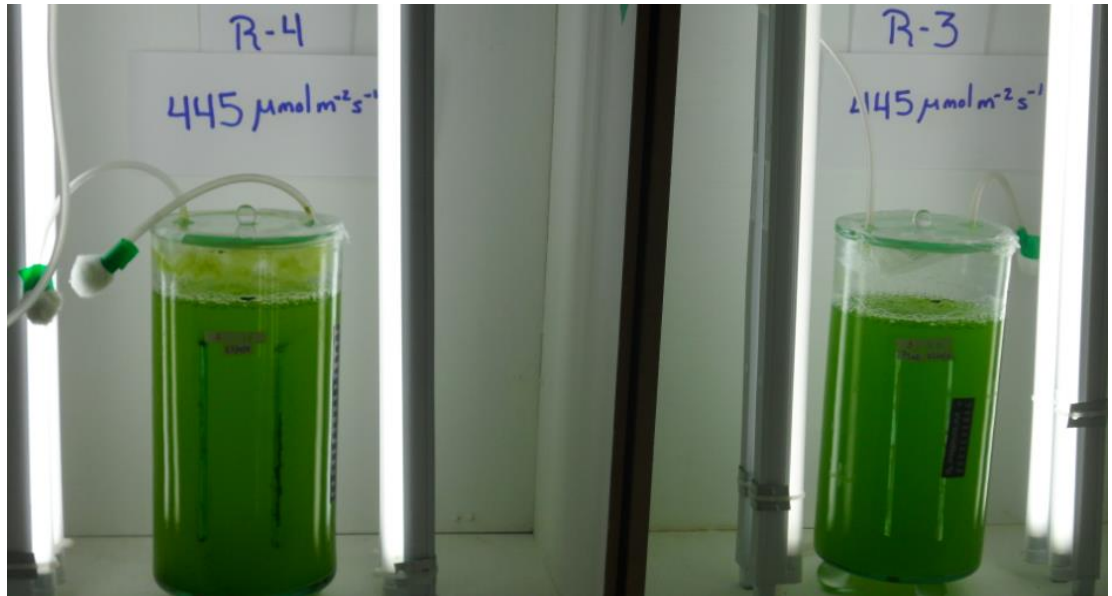


Fig. 21 Ceba A12 (derecha) y cepa A14 (izquierda) a  $445 \mu\text{mol m}^2 \text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  mostrando claramente que la cepa A12 no muestra adherencia en la superficie del Fotobiorreactor

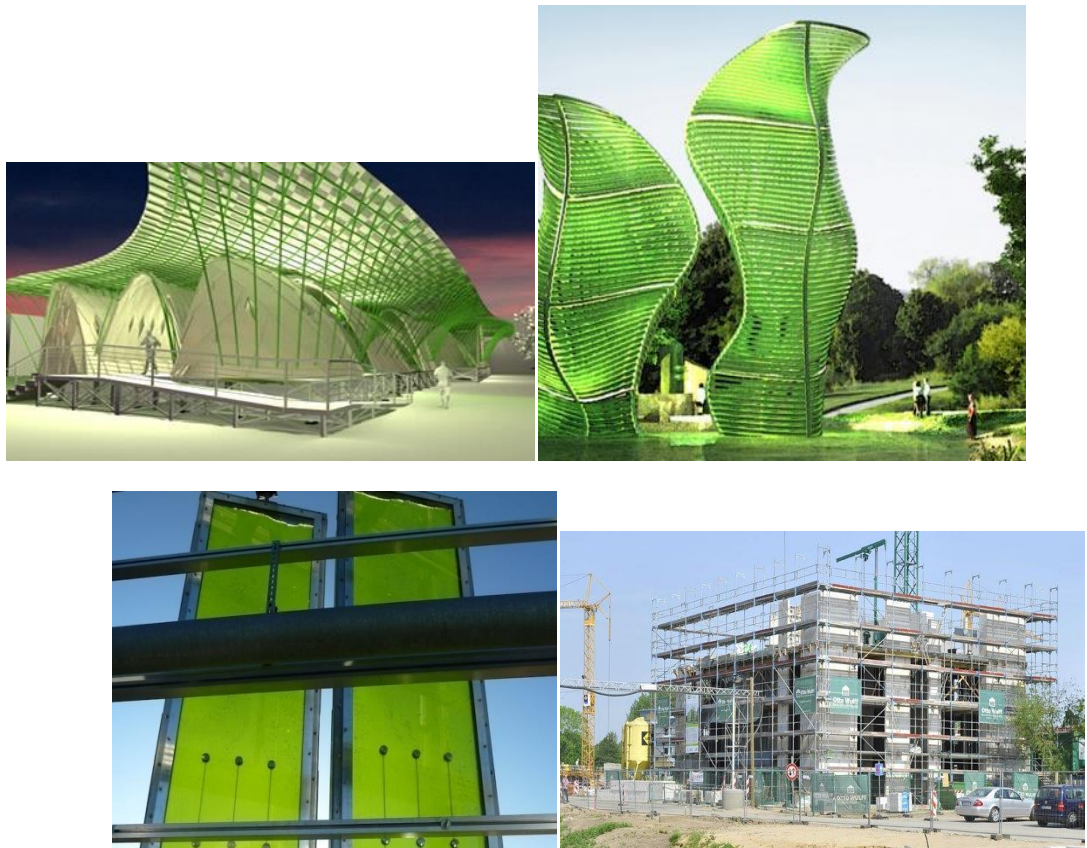






Fig. 22 fotobiorreactores complejos como paneles estructurales y de diseño arquitectónico futurista como sistema de producción.

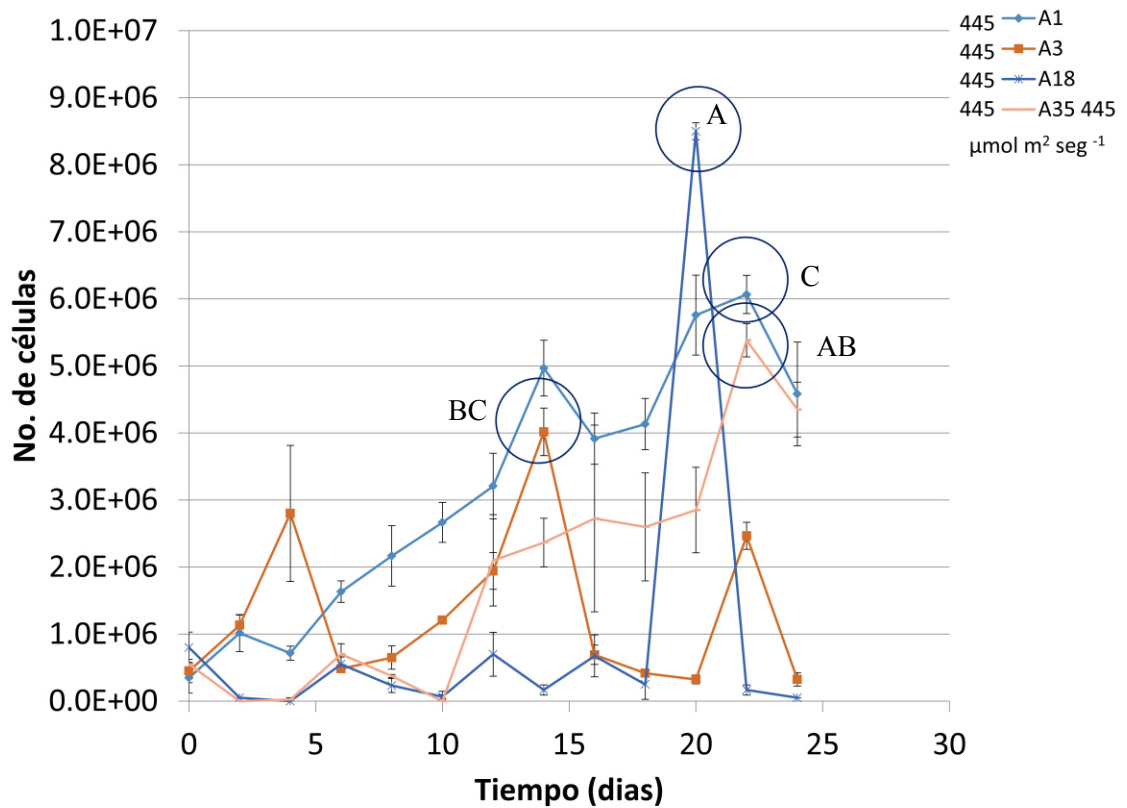


Figura 23. Efecto del nivel de luz sobre el crecimiento celular de las Cepas A1, A3, A18 y A35 a 445  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  a 25°C. En el análisis estadístico realizado con nivel de significancia 0.05 y valor de Tukey 1.2564 si muestra una diferencia significativa representado por letras diferentes.

En las cepas A38, A43 y A47a  $445 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  se encontró un crecimiento máximo de 9.1, 5.8 y 6.3 millones de células por mililitro respectivamente, presentando la cepa A38 su más alto crecimiento a los 22 días. Mientras que la cepa A43 tuvo su máximo crecimiento hasta los 26 días, asimismo la cepa A47 generó 558,000 cel/ml más que la cepa A43 y su mayor crecimiento fue a los 16 días (10 días antes que la cepa A43). La que mayor crecimiento evidenció de las 3 cepas fue la cepa A38 con 9.1 millones de cel/ml (Fig. 24).

Las siguientes cepas A29, A37, A52 y A54 a la misma intensidad de  $445 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ . Tuvieron como resultado un máximo crecimiento de 2.49, 3.1, 3.9 y 4.9 millones de células por mililitro respectivamente. Las cepas A29 y A37 mostraron su máximo crecimiento a los 14 días, mientras que la cepa A54 tuvo su máximo crecimiento a los 24 días con 4.90 millones de cel/ml; sin embargo a los 14 días ya había generado prácticamente el mismo crecimiento (4.89 millones de cel/ml). Por otro lado la cepa A52 a diferencia de las cepas anteriores, fue la que mostró el tiempo de crecimiento más corto, presentando su máximo crecimiento en solo 10 días. De las 4 cepas la A54 tuvo el crecimiento más alto con 4.9 millones de cel/ml (Fig. 25).

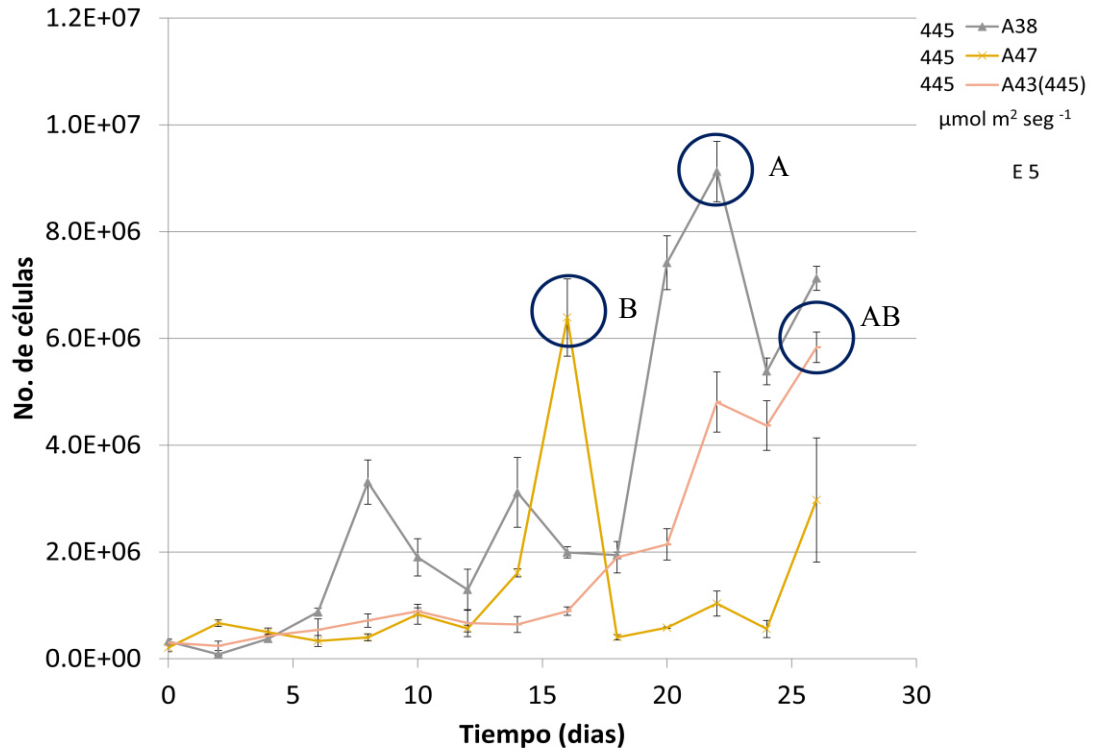


Figura 24. Efecto del nivel de luz sobre el crecimiento celular de las Cepas A38, A47 y A43 a  $445 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ . En el análisis estadístico realizado con nivel de significancia 0.05 y valor de Tukey 1.6498 si muestra una diferencia significativa representado por letras diferentes.

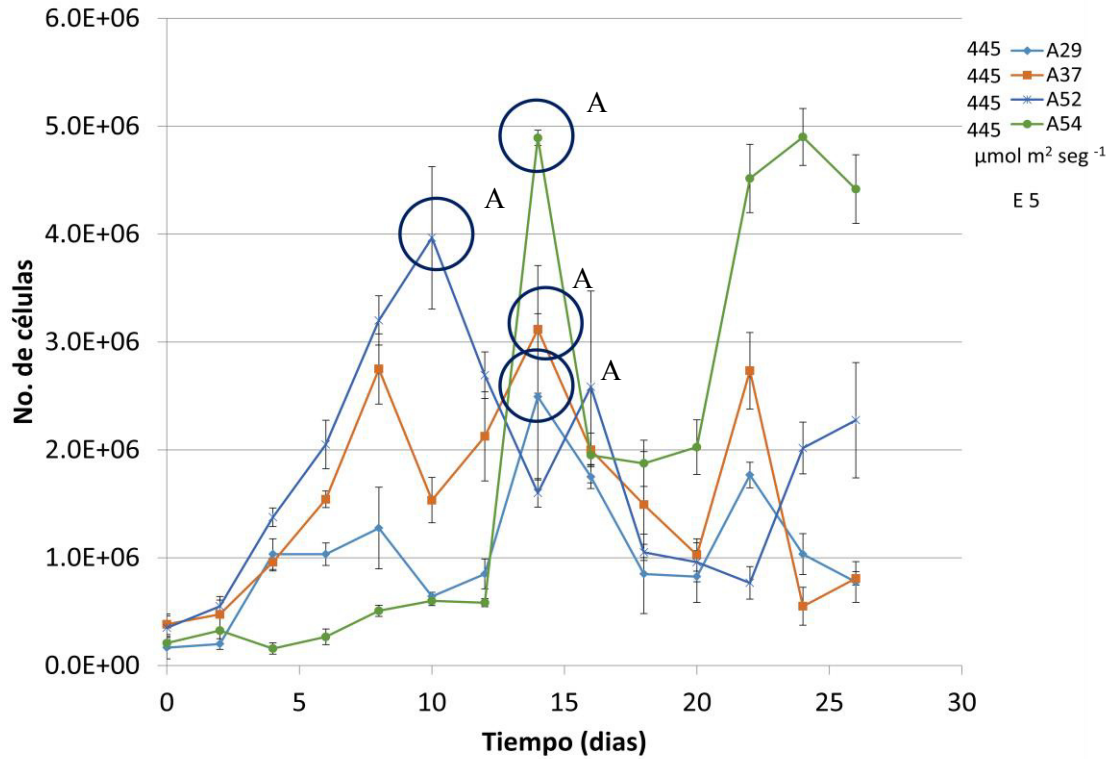


Figura 25. Efecto del nivel de luz sobre el crecimiento celular de las Cepas A29, A37, A52 y A54 a  $445 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ . En el análisis estadístico realizado con nivel de significancia 0.05 y valor de Tukey 1.1121 no muestra una diferencia significativa.

Mientras que en las cepas A33, A61 y A25 a la misma intensidad de  $445 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ . Tuvieron como resultado un máximo crecimiento de 5.8, 4.9 y 5.3 millones de células por mililitro respectivamente. La cepa A61 logró su máximo crecimiento a los 12 días. Por otro lado la cepa A25 a diferencia de las cepas anteriores, fue la que mostró el tiempo de crecimiento más corto, presentando su máximo crecimiento en solo 8 días. Asimismo la cepa A33 tuvo su más alto rendimiento a los 18 días, teniendo el número más alto con 5.8 millones de cel/ml (Fig. 26).

En la figura 27 las cepas A4, A40, A46 y A58 a la misma intensidad de  $445 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ . Se observó un máximo crecimiento de 1.1, 5.1, 5.3 y 3.9 millones de células por mililitro respectivamente. La cepa A4 tuvo su máximo crecimiento en un periodo de 18 días, mientras que la cepa A40 mostró su mayor crecimiento hasta los 26 días. Por otro lado la cepa A46 y la cepa A58 tuvieron su máximo crecimiento a los 14 días de cultivo, siendo la cepa A46 las de mayor crecimiento en comparación a las otras 3.

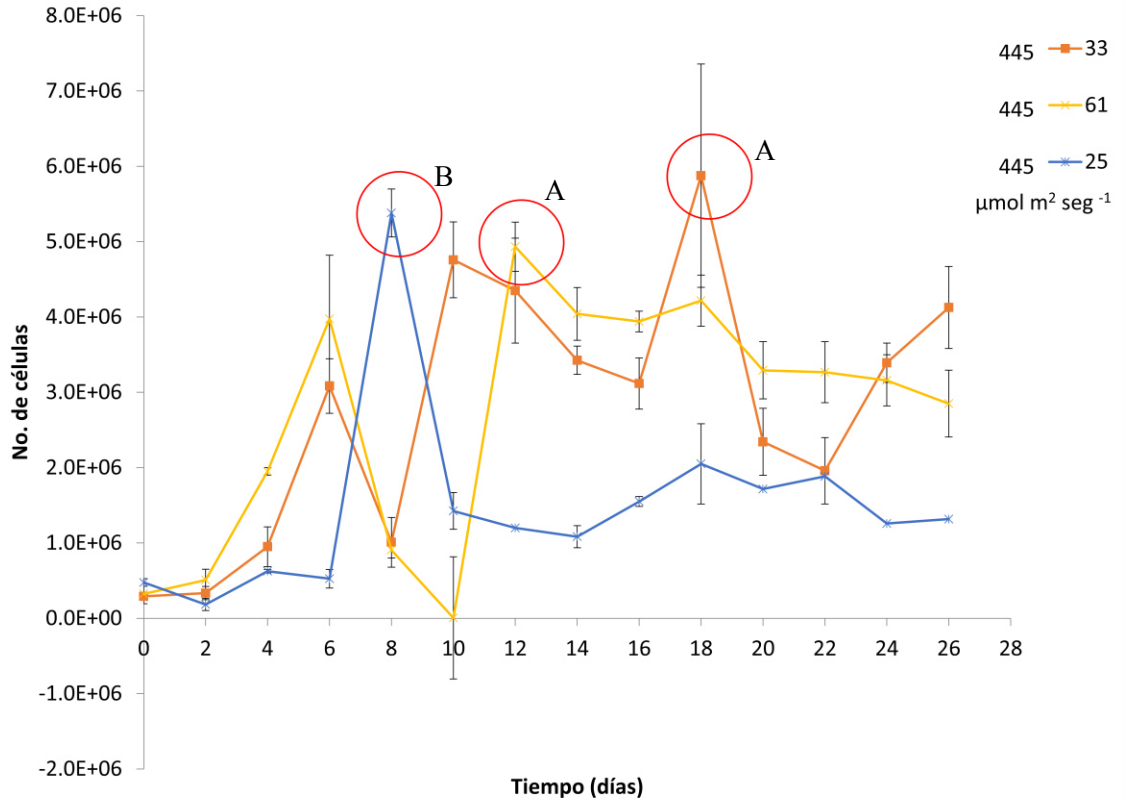


Figura 26 Efecto del nivel de luz sobre el crecimiento celular de las Cepas A33, A61 y A25 a 445  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  a 25°C. En el análisis estadístico realizado con nivel de significancia 0.05 y valor de Tukey 0.9161 si muestra una diferencia significativa representado por letras diferentes.

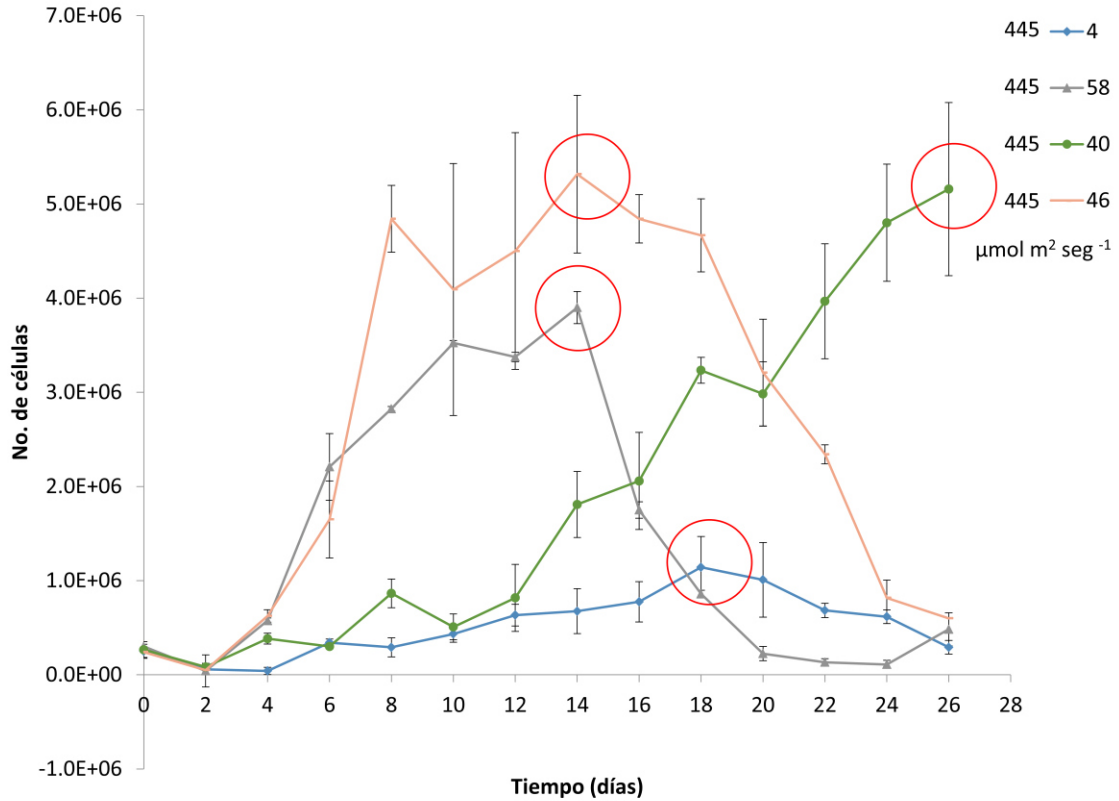


Figura 27 Efecto de la intensidad de luz en las cepas A4, A58, A40 y A46 a  $445 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$

En el siguiente experimento se cultivó a la cepa aislada A46 a 3 diferentes intensidades de luz  $90$ ,  $445$  y  $490 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ . Observándose que a  $490 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  se registró el máximo crecimiento de 10 millones de cel/ml a los 18 días de cultivo, mientras que al ser puesta a una intensidad de  $445 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  tuvo una tasa de crecimiento máxima de 5.3 millones de cel/ml en 14 días y cuando se hizo crecer a  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  evidenció un crecimiento de 2.1 millones de cel/ml a los 20 días de cultivo, siendo ésta la cantidad más baja. Por lo tanto, claramente una mayor intensidad de luz generó una tasa de crecimiento más alta y una baja intensidad de luz provocó una tasa de crecimiento menor (Fig. 28).

También se cultivó a la cepa aislada A43 a las 3 diferentes intensidades de luz  $90$ ,  $445$  y  $490 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ . Teniendo como resultado que a  $490 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  registró un crecimiento máximo de 5.5 millones de cel/ml en 18 días de cultivo, mientras que al ser puesta a una intensidad de  $445 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  tuvo una tasa de crecimiento máxima prácticamente igual a la anterior con 5.8 millones de cel/ml en 26 días solo mostrando

diferencia en los días de cultivo (18 contra 26). Por otro lado cuando se hizo crecer a  $90 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  presentó un crecimiento de 10 millones de cel/ml prácticamente el doble en comparación a las 2 intensidades anteriores en 26 días de cultivo. En este experimento se observó que la menor intensidad de luz generó una tasa de crecimiento más alta y en la intensidad media y alta de luz la tasa de crecimiento fue muy semejante pero menor en comparación a la de  $90 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  (Fig. 29).

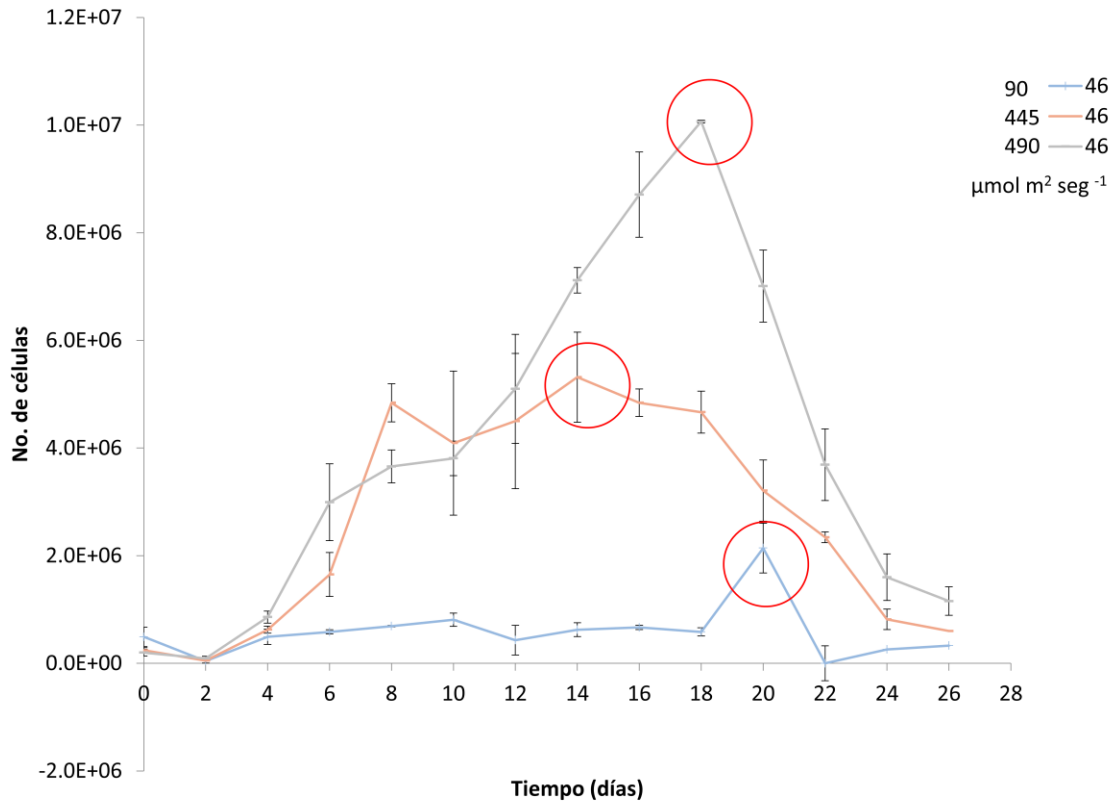


Figura 28 Efecto de la intensidad de luz en las cepas A46 a  $90, 445$  y  $490 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$

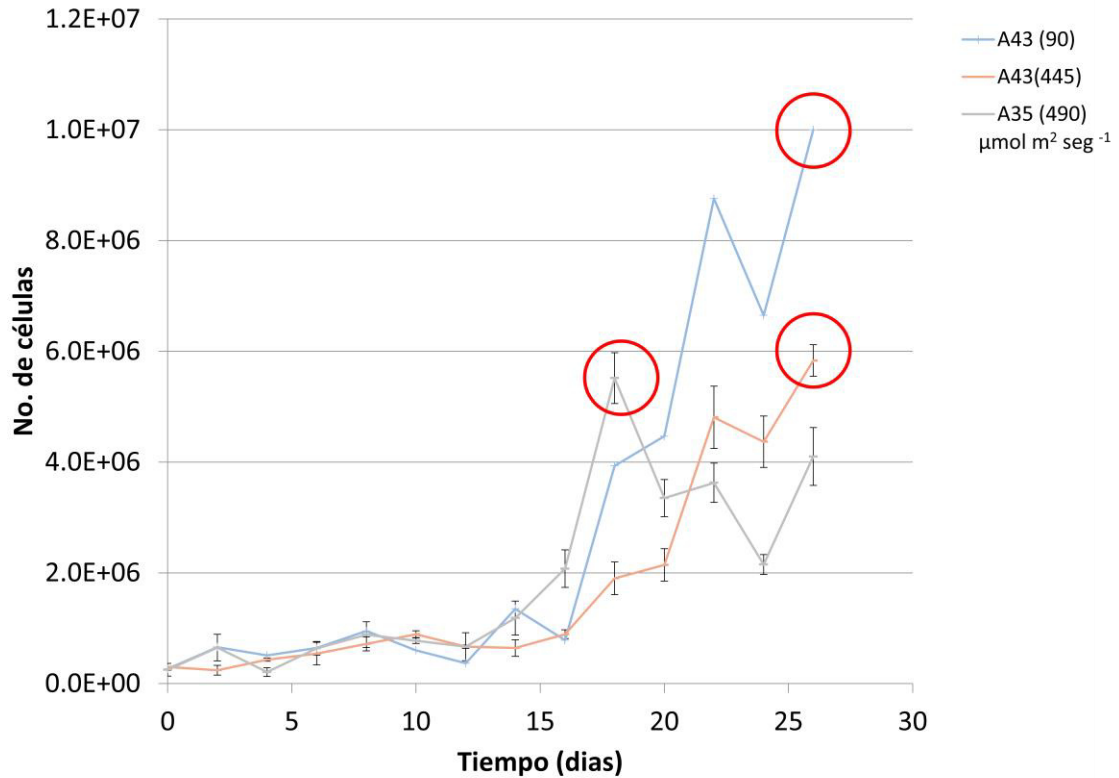


Figura 29 Efecto de la intensidad de luz en las cepas A43 a 90, 445 y 490  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  a 25°C

Igualmente se cultivó a la cepa aislada A35 a 3 diferentes intensidades de luz 90, 445 y 490  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  a 25°C. Arrojando los siguientes resultados: a 490  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  registró un máximo crecimiento de 2.4 millones de cel/ml a los 22 días de cultivo, mientras que al ser puesta a una intensidad un de 445  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  tuvo una tasa de crecimiento máxima de 5.3 millones de cel/ml también en 22 días. Sin embargo cuando se hizo crecer a 90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  presentó un crecimiento de 13.7 millones de cel/ml; prácticamente un 60.7% más en comparación a la intensidad de 445  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  y un 82% más en comparación a la intensidad de 490  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  en los mismos 22 días de cultivo (Fig. 30). En los factores ambientales que afectan a las tasas de crecimiento de las algas unicelulares, la luz está con frecuencia a un nivel inadecuado (Sorokin y Krauss 1958). En este experimento se observó que la menor intensidad de luz generó una tasa de crecimiento mucho más alta y conforme la intensidad lumínica se iba incrementando, la tasa de crecimiento era menor; encontrándose claramente que esta microalga presenta



un crecimiento más óptimo a una menor intensidad luminica (Fig. 31). En el intento de predecir el rendimiento de un alga bajo un conjunto dado de condiciones, es necesario conocer u potencial en condiciones óptimas. Dicha información es básica para la evaluación de estudios fisiológicos y para el diseño y operación de sistemas de cultivo (Sorokin y Krauss 1958).

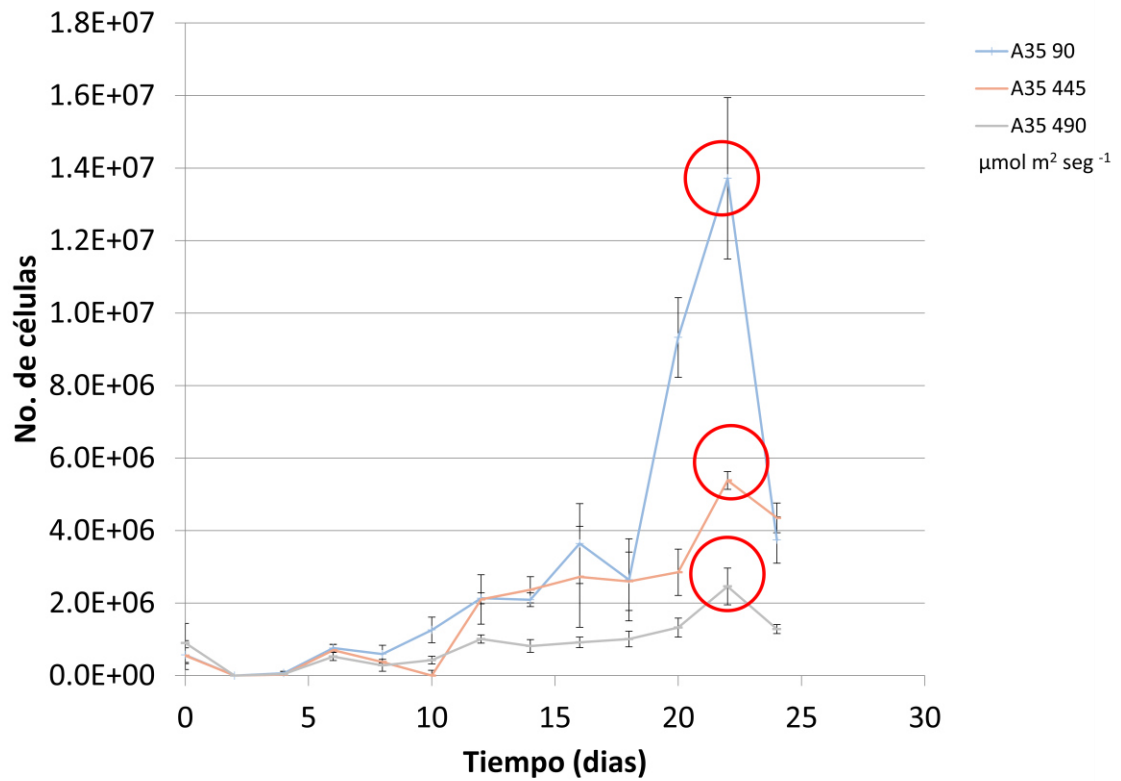


Figura 30 Efecto de la intensidad de luz en las cepas A35 a 90, 445 y 490  $\mu\text{mol m}^2 \text{seg}^{-1}$  a 25°C

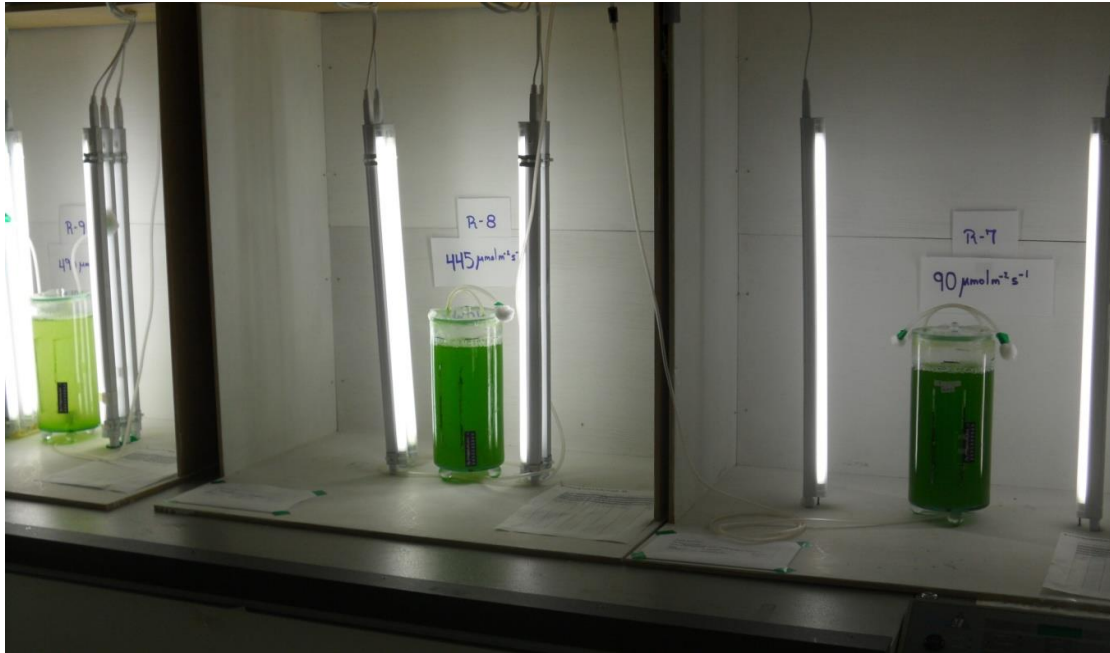


Fig 31 Cepa A35 en fotobiorreactores Air lift a diferentes intensidades de luz de Izquierda a derecha 490, 445 y  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  Encontrándose claramente que esta microalga presenta un crecimiento más óptimo a una menor intensidad luminica.

### 3.3.2.2. Efecto del Nivel de Temperatura sobre el Crecimiento Celular a $32^\circ\text{C}$

Se midió el efecto de la temperatura a  $25$  y  $32^\circ\text{C}$  sobre el crecimiento celular en las distintas cepas de microalgas (A1, A9, A12, A14, A20, A29, A33, A35, A38, A40, A43, A46, A47, A52, A54, A58, A61, A68, A204) a una intensidad de  $90$ ,  $445$  y  $490 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  para su evaluación y comparación con la figura 10 y de la figura 13 a la 20; las cuales se pusieron a crecer bajo los mismos parámetros a  $25^\circ\text{C}$ .

En el siguiente experimento (Fig. 32) las cepas A9, A12, A14, A20, A29, A35, A46, A58 y A61 se pusieron a crecer a  $445 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  mientras que la cepa A35 se hizo crecer a  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  y la cepa A46 a  $490 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  Todas a una temperatura de  $32^\circ\text{C}$ . Presentando los siguientes resultados la cepa A9 tuvo un crecimiento máximo de 4.3 millones de células por mililitro en 26 días, mientras que la cepa A12 fue la que desarrollo el crecimiento más alto de este experimento con 19.4 millones de células por mililitro en 22 días, sin embargo este crecimiento fue menor al mostrado a  $25^\circ\text{C}$  el cual fue de 28 millones de células por mililitro en los mismos 22 días de cultivo (Fig. 10);

asimismo la cepa A14 manifestó un crecimiento de 2.7 millones de células por mililitro en 16 días, pero también este crecimiento fue menor al mostrado a 25°C el cual fue de 13.5 millones de células por mililitro en 20 días de cultivo (Fig. 20); también la cepa A20 generó un crecimiento de 1.5 millones de células por mililitro en 16 días, y también este crecimiento fue menor al mostrado a 25°C el cual fue de 16.7 millones de células por mililitro en 22 días de cultivo (Fig. 20); por otro lado, la cepa A29 tuvo un crecimiento de 3.5 millones de células por mililitro en 18 días, crecimiento mayor al mostrado a 25°C el cual fue de 2.49 millones, asimismo la cepa A58 desarrolló un crecimiento de 1.7 millones de células por mililitro en 6 días, siendo este crecimiento menor al mostrado a 25°C el cual fue de 3.9 millones de células por mililitro en 14 días de cultivo (Fig. 27); también la cepa A61 mostró un crecimiento de 2.7 millones de células por mililitro en 26 días, este crecimiento fue menor al mostrado a 25°C el cual fue de 4.9 millones de células por mililitro en 12 días de cultivo (Fig. 16); Por otro lado la cepa A35 que se puso a crecer a  $90 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a 32°C generó un crecimiento de 1.2 millones de células por mililitro en 22 días, pero este crecimiento fue menor al mostrado a 25°C el cual fue de 13.7 millones de células por mililitro en 22 días de cultivo (Fig. 30); Asimismo la cepa A46 que se puso a crecer a  $490 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a 32°C presentó un crecimiento de 1.6 millones de células por mililitro en 22 días, este crecimiento también fue menor al mostrado a 25°C el cual fue de 10 millones de células por mililitro en 18 días de cultivo (Fig. 28). Todas las cepas presentaron un menor crecimiento en comparación a los resultados obtenidos a 25°C con excepción de la cepa A29 que mostró un incremento de un 28.8% a 32°C

En este experimento las cepas A1, A33, A38, A40, A43, A47, A52 y A54 se pusieron a crecer a  $445 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  mientras que la cepa A43 se hizo crecer a 90 y  $490 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  Todas a una temperatura de 32°C. Presentando los siguientes resultados la cepa A1 tuvo un crecimiento máximo de 8.3 millones de células por mililitro en 10 días, mientras que la cepa A33 desarrollo un crecimiento de 11.5 millones de células por mililitro en 24 días, asimismo la cepa A38 manifestó un crecimiento de 11.7 millones de células por mililitro en 22 días, también la cepa A40 generó un crecimiento de 14.4 millones de células por mililitro en 10 días, además la cepa A47 tuvo un crecimiento de 7.2 millones de células por mililitro en 24 días, igualmente la cepa A52 desarrolló un

crecimiento de 7.9 millones de células por mililitro en 18 días, también la cepa A54 mostró un crecimiento de 6 millones de células por mililitro en 20 días. Por otro lado la cepa A43 que se puso a crecer a  $90 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a  $32^\circ\text{C}$  generando un crecimiento de 12.8 millones de células por mililitro en 24 días, mientras que cuando se puso a crecer a  $490 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a  $32^\circ\text{C}$  presentó un crecimiento aun mayor que el anterior con 16 millones de células por mililitro en un menor tiempo (18 días). Todas las cepas presentaron un mayor crecimiento a  $32^\circ\text{C}$  en comparación al experimento realizado a  $25^\circ\text{C}$  destacando las cepas A33, A38 A40 y A43 con las tasas de crecimiento más altas (Fig. 33).

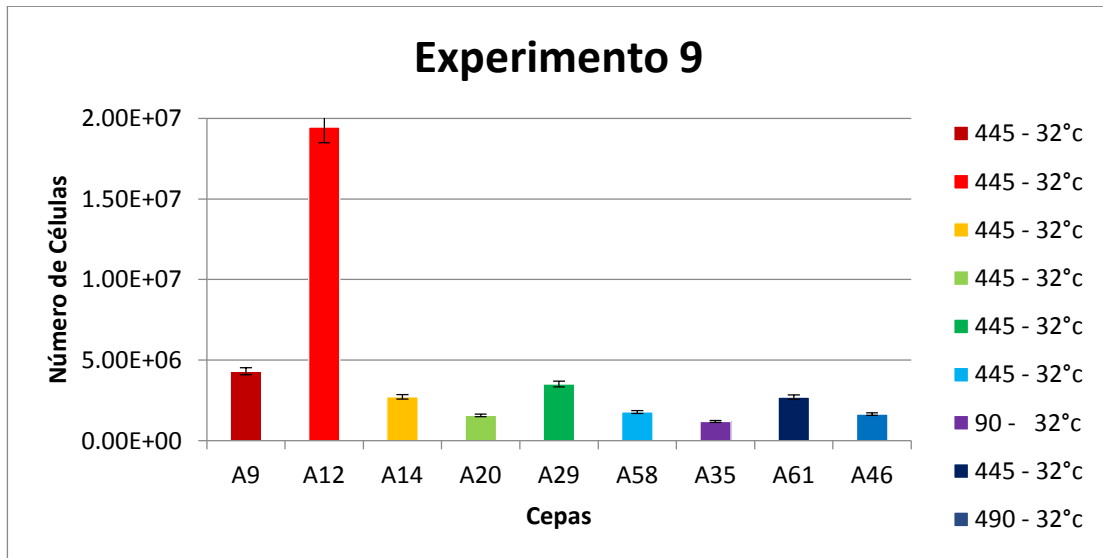


Fig 32 Efecto del Nivel de Temperatura sobre el Crecimiento Celular a  $32^\circ\text{C}$

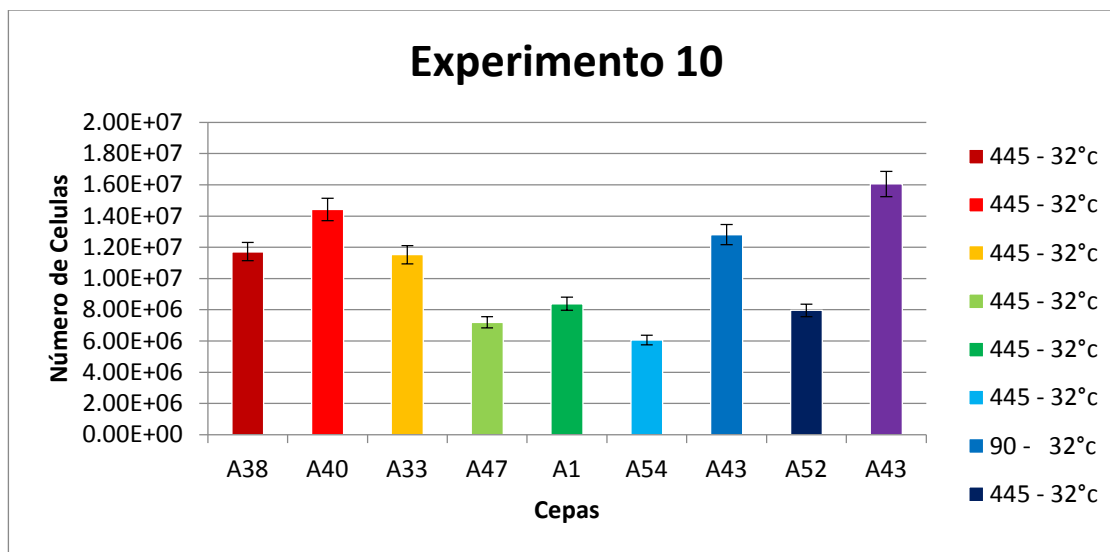


Fig 33 Efecto del Nivel de Temperatura sobre el Crecimiento Celular a 32°C

### 3.3.2.3. Efecto del Fosfato y Nitrato sobre el crecimiento celular.

#### 3.3.2.3.1 Efecto de alta concentración de Fosfato y Nitrato sobre el crecimiento

En este experimento se utilizaron las cepas A12, A14, A18 y A20 se pusieron a crecer a  $445 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  mientras que la cepa A35 se hizo crecer a  $90 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$ . Todas a una concentración alta de  $\text{NaNO}_3$  14.71mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42mM a 25°C. Presentando los siguientes resultados la cepa A12 tuvo un crecimiento máximo de 291,000 células por mililitro en 8 días, mientras que la cepa A14 desarrollo un crecimiento de 500,000 células por mililitro en 20 días, asimismo la cepa A18 manifestó un crecimiento de 5.8 millones de células por mililitro en 10 días, también la cepa A20 generó un crecimiento de 741,667 células por mililitro en 16 días, mientras que la cepa A35 tuvo un crecimiento de 650,000 células por mililitro en 16 días (Fig. 34). Por lo tanto en este experimento de concentraciones altas de Fosfatos y Nitratos la cepa A18 fue la que mostró una tasa de crecimiento más alta.

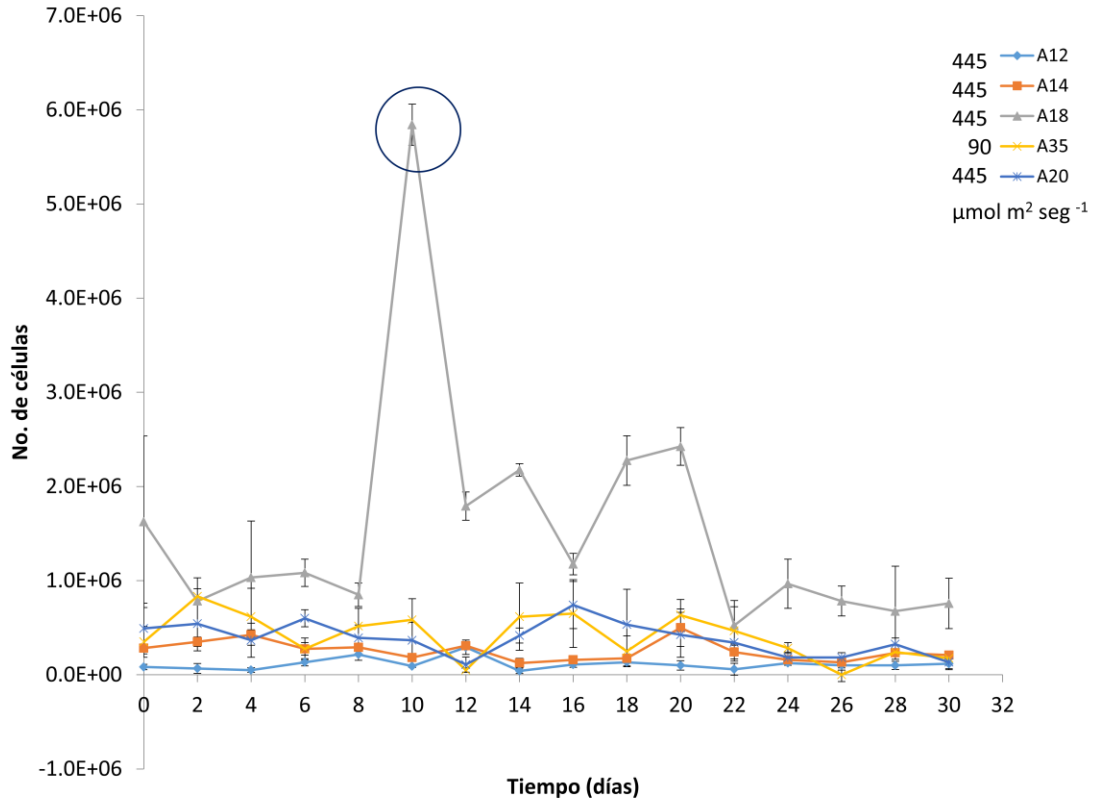


Figure 34 Efecto de la concentración alta de Nitrato ( $\text{NaNO}_3$  14.71mM) y Fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42mM) a  $25^\circ\text{C}$  sobre el crecimiento celular.

En este experimento se utilizaron las cepas A4, A25 y A33 se pusieron a crecer a  $445 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  mientras que la cepa A43 se hizo crecer a  $490 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  Todas a una concentración alta de  $\text{NaNO}_3$  14.71mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42mM a  $25^\circ\text{C}$ . Presentando los siguientes resultados la cepa A4 tuvo un crecimiento máximo de 633,333 células por mililitro en 10 días, mientras que la cepa A25 desarrollo un crecimiento de 608,000 células por mililitro en 22 días, asimismo la cepa A33 manifestó un crecimiento de 1.5 millones de células por mililitro en 18 días (Fig. 35). Mientras que la cepa A43 tuvo un crecimiento de 3.8 millones de células por mililitro en 12 días (Fig. 36). Por lo tanto en este experimento de concentraciones altas de Fosfatos y Nitratos la cepa A43 fue la que mostró la tasa de crecimiento más alta.

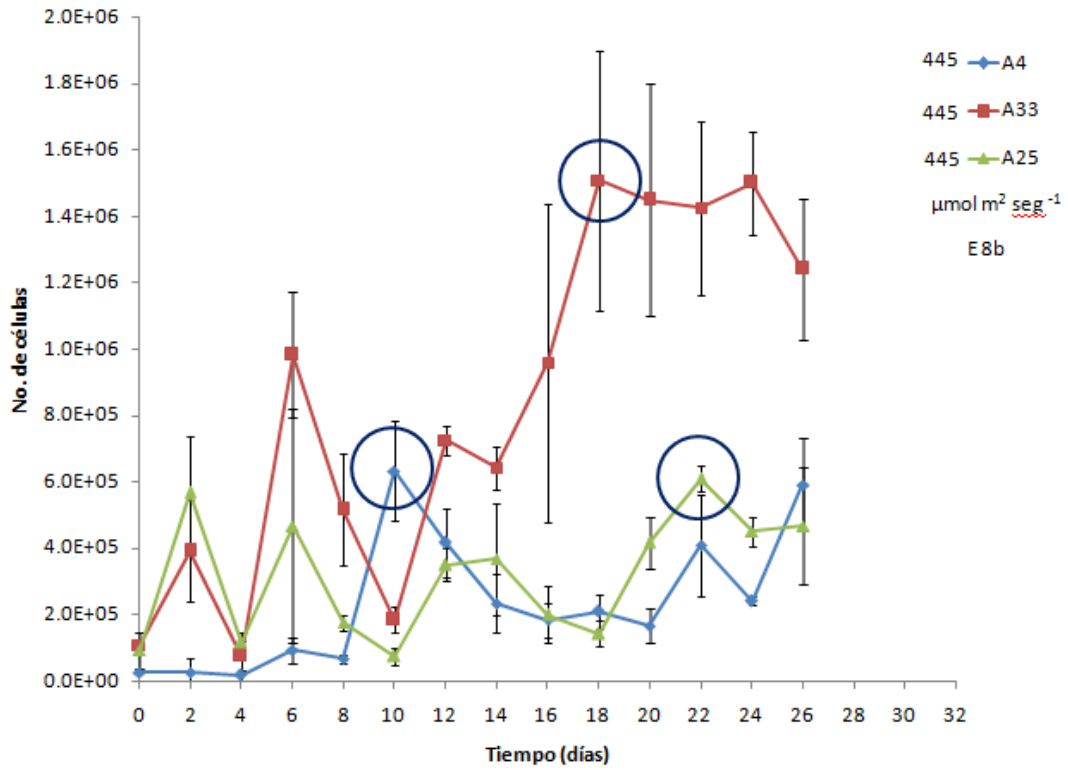


Fig. 35 Efecto de la concentración alta de Nitrato ( $\text{NaNO}_3$  14.71mM) y Fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42mM) a  $25^\circ\text{C}$  sobre el crecimiento celular.

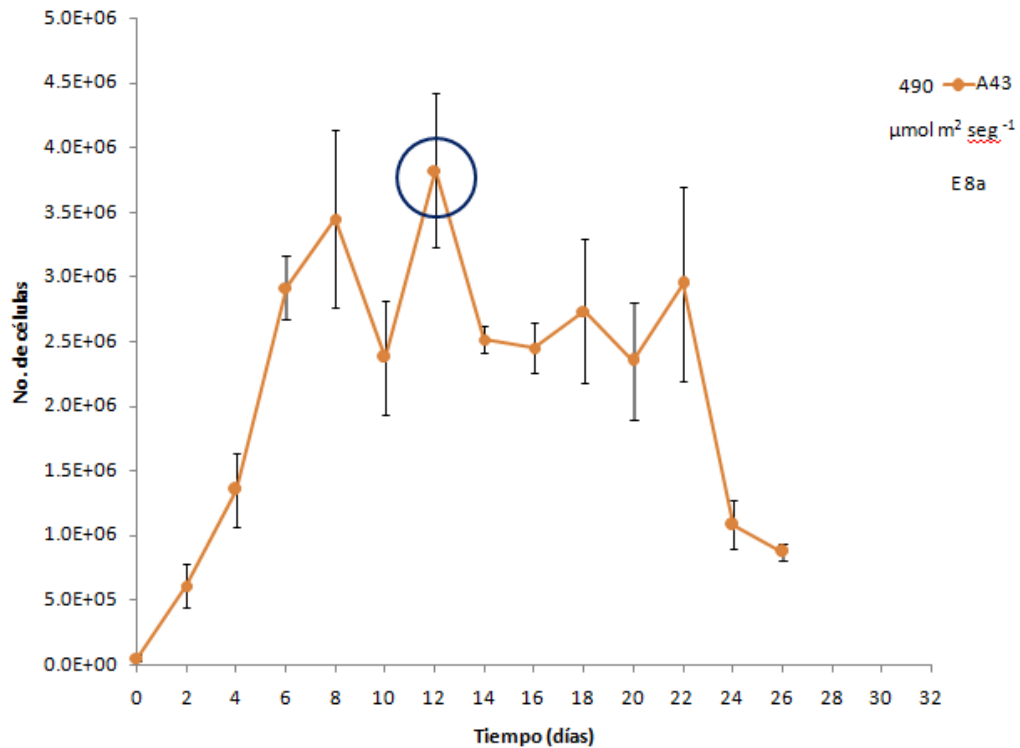


Fig. 36 Efecto de la concentración alta de Nitrato ( $\text{NaNO}_3$  14.71mM) y Fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42mM) a  $25^\circ\text{C}$  sobre el crecimiento celular

### 3.3.2.3.2 Efecto de baja concentración de Fosfato y Nitrato sobre el crecimiento celular.

En este experimento se utilizaron las cepas A12, A14, A18 y A43 se pusieron a crecer a  $445 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  mientras que la cepa A43 se hizo crecer a  $490 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  Todas a una concentración baja de  $\text{NaNO}_3$  1.47mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642mM a  $25^\circ\text{C}$ . Presentando los siguientes resultados la cepa A12 tuvo un crecimiento máximo de 8.9 millones de células por mililitro en 30 días, mientras que la cepa A14 desarrollo un crecimiento de 6.1 millones de células por mililitro en 28 días, asimismo la cepa A18 manifestó un crecimiento de 1.1 millones de células por mililitro en 14 días, Mientras que la cepa A43 tuvo un crecimiento de 25.2 millones de células por mililitro en 28 días (Fig. 37). Por lo tanto en este experimento de concentraciones bajas de Fosfatos y Nitratos la cepa A43 fue la que mostró la tasa de crecimiento más alta.

En este experimento se utilizaron las cepas A4, A25 y A33 se pusieron a crecer a  $445 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  Todas a una concentración baja de  $\text{NaNO}_3$  1.47mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642mM a  $25^\circ\text{C}$ . Presentando los siguientes resultados la cepa A4 tuvo un crecimiento máximo de 4.2 millones de células por mililitro en 20 días, mientras que la cepa A25 desarrollo un crecimiento de 3.7 millones de células por mililitro en 24 días, asimismo la cepa A33 manifestó un crecimiento de 5.2 millones de células por mililitro en 6 días (Fig. 38). Por lo tanto en este experimento de concentraciones bajas de Fosfatos y Nitratos la cepa A33 fue la que mostró la tasa de crecimiento más alta.



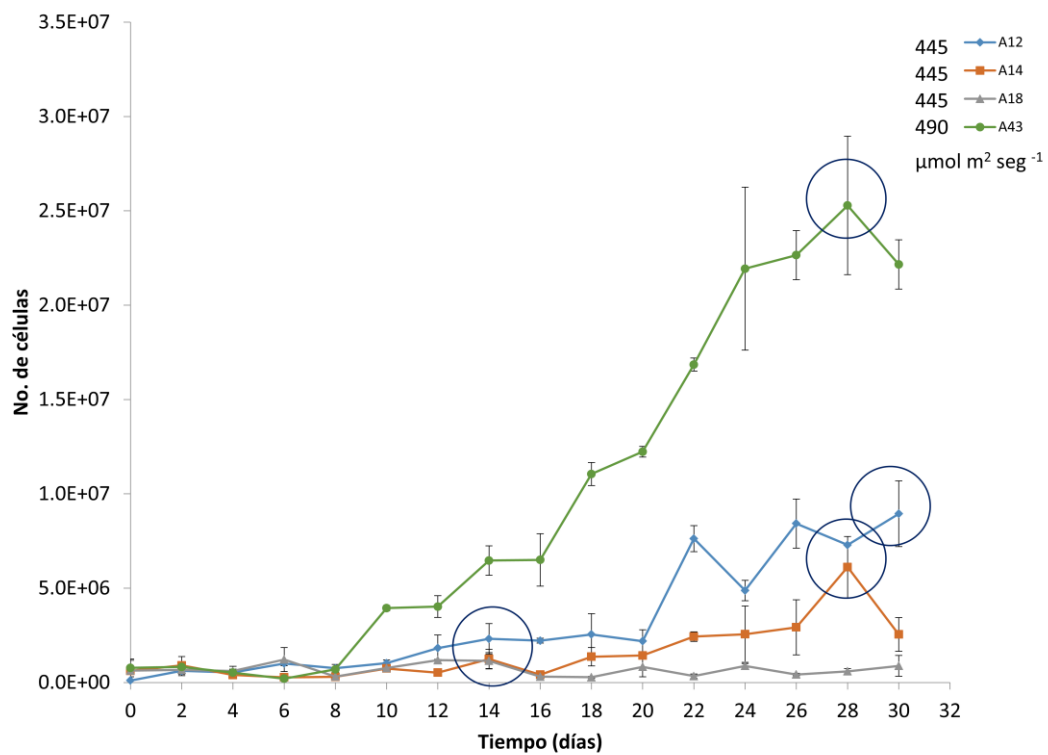


Fig. 37 Efecto de la concentración baja de Nitrato ( $\text{NaNO}_3$  1.47mM) y Fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642mM) a  $25^\circ\text{C}$  sobre el crecimiento celular.

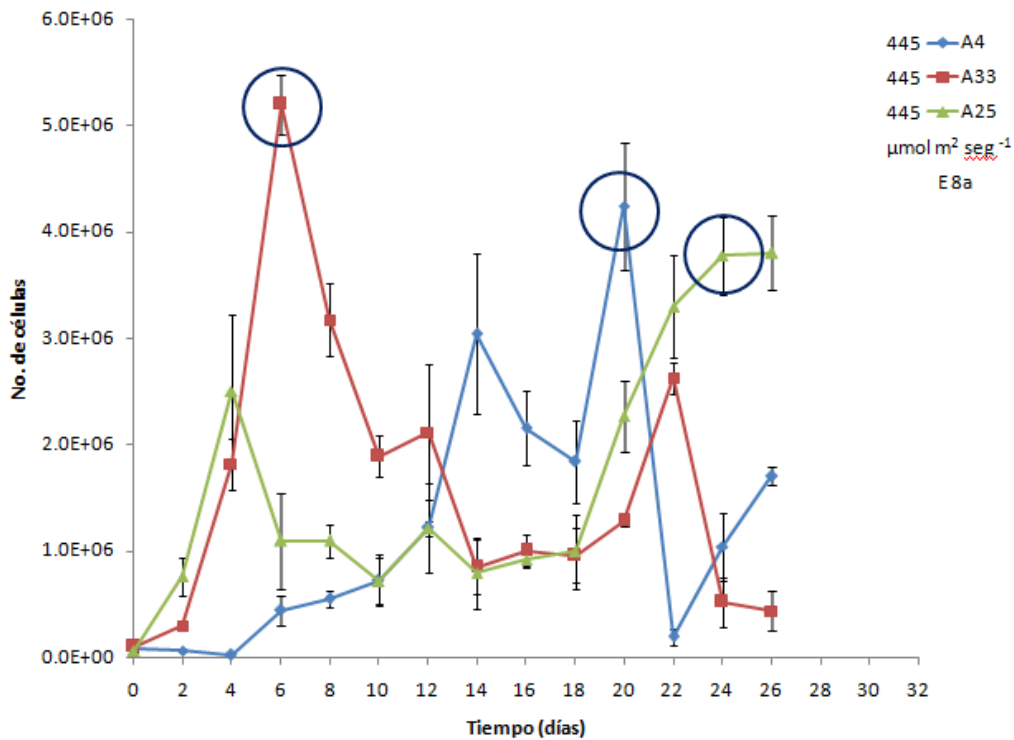


Fig. 38 Efecto de la concentración baja de Nitrato ( $\text{NaNO}_3$  1.47mM) y Fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642mM) a  $25^\circ\text{C}$  sobre el crecimiento celular.

En este experimento se utilizó la cepa A20 a  $445 \mu\text{mol m}^2 \text{seg}^{-1}$  mientras que la cepa A35 se hizo crecer a  $90 \mu\text{mol m}^2 \text{seg}^{-1}$ . Las dos a una concentración baja de  $\text{NaNO}_3$   $1.47\text{mM}$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0.642\text{mM}$  a  $25^\circ\text{C}$ . Presentando los siguientes resultados la cepa A20 tuvo un crecimiento máximo de 3.5 millones de células por mililitro en 6 días, mientras que la cepa A35 presentó un crecimiento de 1.3 millones de células por mililitro en 22 días (Fig. 39). Por lo tanto en este experimento de concentraciones bajas de Fosfatos y Nitratos la cepa A20 fue la que mostró la tasa de crecimiento más alta.

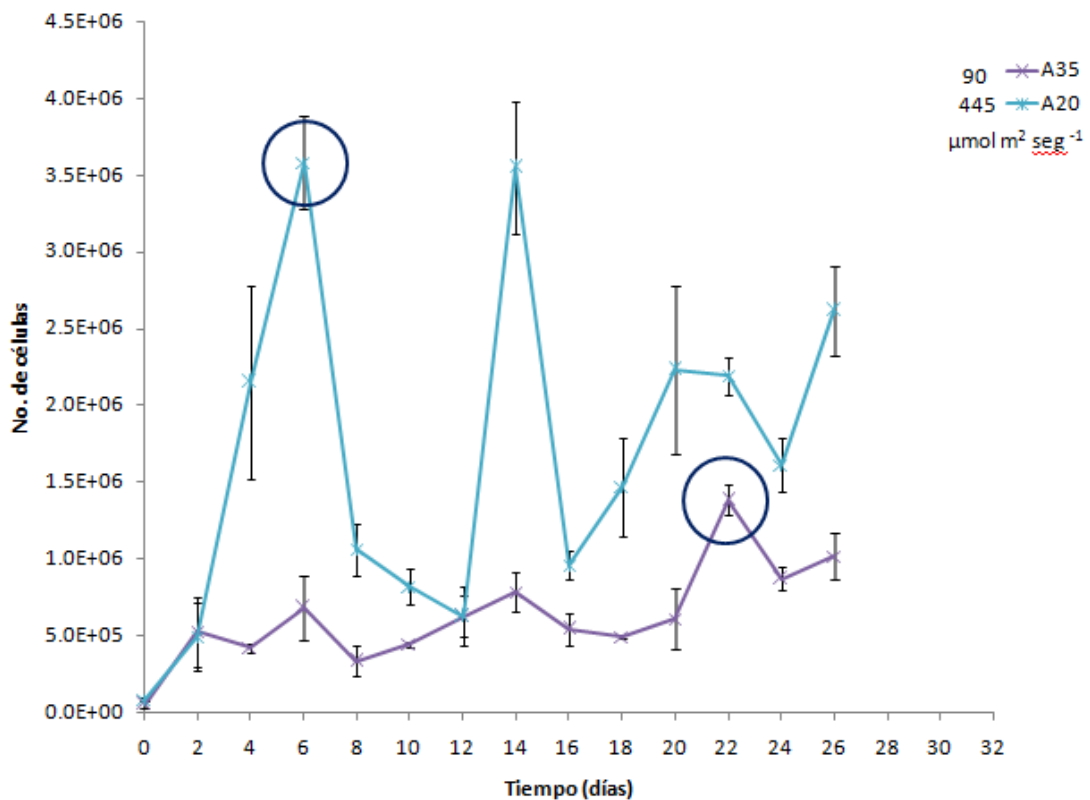


Fig. 39 Efecto de la concentración baja de Nitrato ( $\text{NaNO}_3$   $1.47\text{mM}$ ) y Fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0.642\text{mM}$ ) a  $25^\circ\text{C}$  sobre el crecimiento celular.

3.3.2.3.3 Efecto de baja, media y alta concentración de Fosfato y Nitrato sobre el crecimiento celular en la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) y la cepa A204 de 4 Ciénegas Coah.

En este experimento se utilizó la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) a 90, 445 y 490  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a una concentración baja, media (normal) y alta de  $\text{NaNO}_3$  1.47, 2.94 y 14.71mM) y una concentración baja, media (normal) y alta de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.642, 1.28 y 6.42mM) a 25 y 32°C mientras que la cepa A204 se hizo crecer a 445  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a una concentración alta de  $\text{NaNO}_3$  14.71mM y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42mM a 25°C. Presentando los siguientes resultados la cepa de *N. oleoabundans* (A68) a una concentración de media (normal) de Nitrato y fosfato a 445  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a 32°C tuvo un crecimiento máximo de 1.8 millones de células por mililitro en 8 días, mientras que con una concentración alta de Nitrato y Fosfato con 445  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a 25°C la cepa A68 desarrollo un crecimiento de 341,666 células por mililitro en 16 días, asimismo bajo las mismas condiciones pero ahora con bajas concentraciones de Nitrato y Fosfato la cepa A68 manifestó un crecimiento de 3.7 millones de células por mililitro en 20 días, también a las mismas condiciones anteriores pero a 90  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  generó un crecimiento de 1.9 millones de células por mililitro en 12 días, inclusive a las mismas condiciones anteriores pero a 490  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  Desarrollo un bajo crecimiento de 833,333 células por mililitro en 22 días, cuando la cepa *N. oleoabundans* (A68) se puso a crecer a 90  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a una concentración alta de  $\text{NaNO}_3$  14.71mM y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42mM a 25°C presentó una tasa de crecimiento 716,666 células por mililitro en 26 días, también a una concentración media de Nitrato y Fosfato a 445  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a 25°C tuvo un crecimiento de 591,666 células por mililitro en 12 días, además cuando se puso con una concentración alta de Nitratos y fosfatos pero a 490  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a 25°C desarrolló un crecimiento de 1.06 millones de células por mililitro en 26 días, mientras que la cepa A204 a una concentración alta de  $\text{NaNO}_3$  14.71mM y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42mM a 445  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a 25°C presentó una tasa de crecimiento 5 millones de células por mililitro en 26 días (Fig. 40). Por lo tanto en este experimento las mas destacadas son la cepa A68 con Nitratos y fosfatos en concentración baja con 445  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a 25°C con

3.7 millones de células por mililitro y la cepa A204 con 5 millones de células por mililitro, asimismo cuando se hicieron crecer a concentraciones altas de Nitratos y Fosfatos el tiempo de crecimiento fue mayor en general con 3 cepas en 26 días y una cepa con 16 días.

En este experimento se utilizó la cepa de referencia *N. oleoabundans* (A68) a 90, 445 y 490  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a una concentración baja y alta de  $\text{NaNO}_3$  (1.47 y 14.71mM) y una concentración baja y alta de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.642 y 6.42mM) solamente a 32°C, mientras que la cepa A204 se hizo crecer a 445  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a una concentración media (normal) y baja de  $\text{NaNO}_3$  (2.94 y 1.47mM) y una concentración media (normal) y baja de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.28 y 0.642mM) a 25 y 32°C Presentando los siguientes resultados la cepa A204 a una concentración media (normal) de Nitrato y fosfato a 445  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a 32°C tuvo un crecimiento máximo de 6.3 millones de células por mililitro en 12 días, y cuando se hizo crecer bajo las mismas condiciones pero a 25°C presentó un crecimiento de 5 millones de células por mililitro en 22 días, posteriormente se colocó a las mismas condiciones anteriores de intensidad de luz y temperatura pero ahora con una concentración baja de  $\text{NaNO}_3$  (1.47mM) y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.642mM) generó un crecimiento de 2.4 millones de células por mililitro en 24 días. Por otro lado la cepa A68 con una concentración alta de  $\text{NaNO}_3$  14.71mM y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42mM con 445  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a 32°C desarrolló un crecimiento de 2.7 millones de células por mililitro en 20 días, mientras que con una concentración baja de  $\text{NaNO}_3$  (1.47mM) y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.642mM) a 32°C la cepa *N. oleoabundans* (A68) generó un crecimiento de 4 millones de células por mililitro en 24 días, asimismo bajo las mismas condiciones de Nitrato, Fosfato y temperatura pero ahora a 90  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  la cepa *N. oleoabundans* (A68) manifestó un crecimiento de 1 millón de células por mililitro en 6 días, también a las mismas condiciones anteriores de Nitrato, Fosfato y temperatura pero a 490  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  generó un crecimiento de 1.1 millones de células por mililitro en 24 días, asimismo cuando se puso a crecer a concentraciones altas de  $\text{NaNO}_3$  14.71mM y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42mM con 90  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a 32°C desarrolló un crecimiento de 716,666 de células por mililitro en 10 días, inclusive a las mismas condiciones anteriores pero a 490  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  generó un crecimiento de 866,666 cel/ml en 12 días (Fig. 41). Por lo tanto en este experimento las más destacadas

son la cepa A68 (cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185) con Nitratos y fosfatos en concentración baja con  $445 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a  $32^\circ\text{C}$  con 4 millones de cel/ml y la cepa A 204 cuando se hizo crecer a concentración media (normal) de Nitratos y fosfatos con  $445 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a 25 y  $32^\circ\text{C}$  con 5 y 6.3 millones de cel/ml respectivamente.

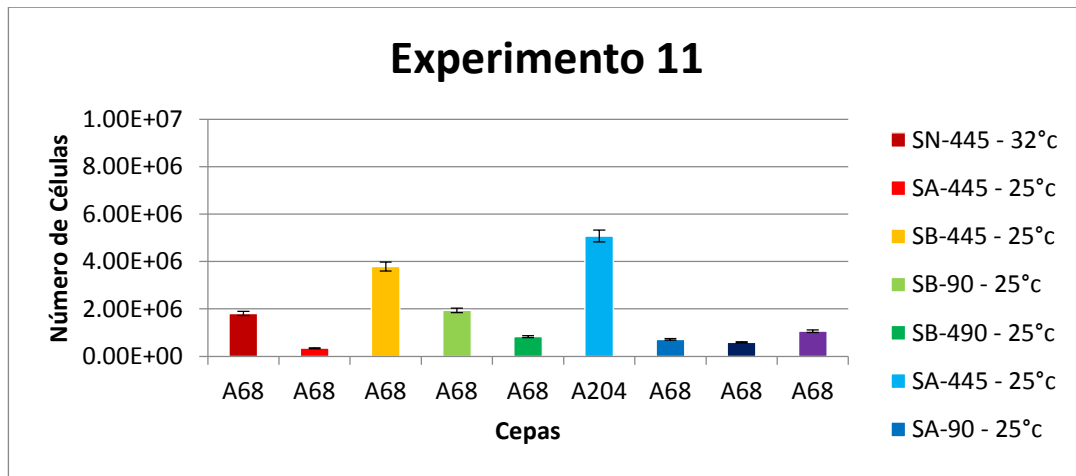


Fig 40 Efecto del Fosfato y Nitrato sobre el crecimiento celular a 25 y  $32^\circ\text{C}$  Nota: LB=  $90 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  LN=  $445 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$ , LA=  $490 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$ , SB= Efecto de Fosfato  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a (0.642mMol) y Nitrato  $\text{NaNO}_3$  (1.47mMol), SN= Efecto de Fosfato  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a (1.29mMol) y Nitrato  $\text{NaNO}_3$  (2.94mMol), SA= Efecto de Fosfato  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a (6.42mMol) y Nitrato  $\text{NaNO}_3$  (14.71mMol).

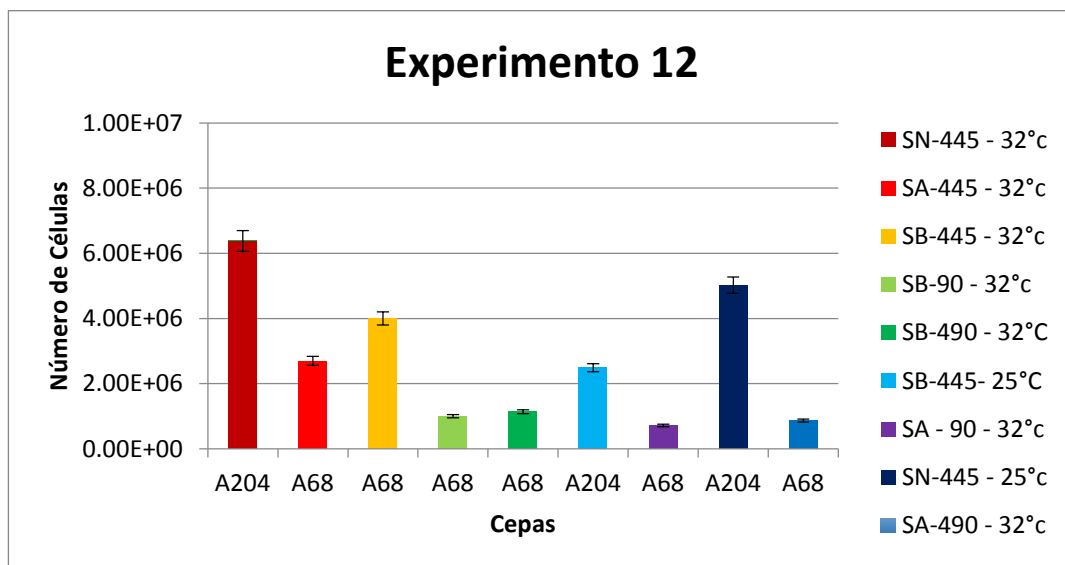


Fig. 41 Efecto del Fosfato y Nitrato sobre el crecimiento celular a 25 y  $32^\circ\text{C}$  Nota: LB=  $90 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  LN=  $445 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$ , LA=  $490 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$ , SB= Efecto de Fosfato  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a (0.642mMol) y Nitrato  $\text{NaNO}_3$  (1.47mMol), SN= Efecto de Fosfato  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a (1.29mMol) y Nitrato  $\text{NaNO}_3$  (2.94mMol), SA= Efecto de Fosfato  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a (6.42mMol) y Nitrato  $\text{NaNO}_3$  (14.71mMol).

### 3.3.3. Determinación de lípidos neutros

Primeramente se llevaron a cabo las pruebas de control (+) y control (-) con la sonda fluorescente Rojo Niloque se utilizó para la detección de lípidos neutros, en donde se observa claramente que al estar el Rojo Nilo en contacto solamente con agua, causa una baja intensidad de 20 u.a. de fluorescencia a los 640-650 nm aproximadamente, en cambio, cuando se mezcló la sonda, con los estándar lipids ( F.A.M.E.) Mostró una intensidad de fluorescencia de 150 u.a.a una longitud de onda de 580nm., que es la longitud de onda del rango de los lípidos neutros (Fig. 42).

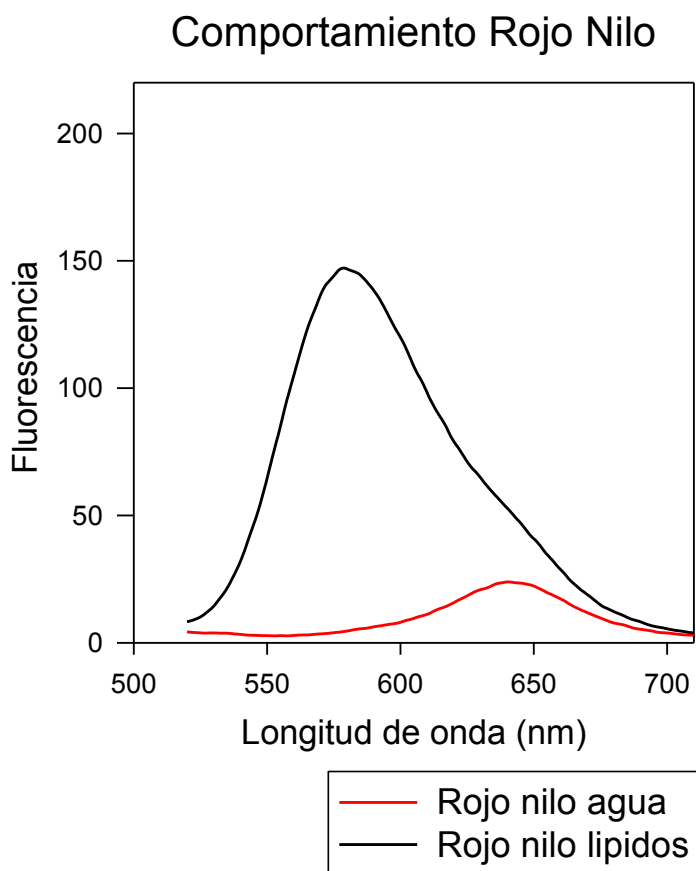


Fig. 42 Control positivo, Rojo Nilo + lípidos (línea negra) y Control negativo, Rojo Nilo + agua desionizada (línea roja) de la sonda fluorescente.

### 3.3.3.1. Determinación de lípidos neutros en cepas seleccionadas sin estrés

Posteriormente se determinó la cantidad de lípidos neutros mediante la sonda fluorescente Rojo Nilo, en todas las cepas sin estrés previamente seleccionadas con el colorante Sudan IV. Para realizar las medidas de intensidad de fluorescencia fue necesario ajustar el cultivo de microalgas a una densidad óptica de 0.25 obteniendo que la cepa A1 mostró un índice de fluorescencia de 15 unidades (unidades arbitrarias) en el rango de los lípidos polares, mientras que la cepa A3 generó un índice alto de 52 unidades entre una combinación de lípidos polares (610-630nm) y neutros (570-590nm), y la cepa A9 que presentó un índice de 23 unidades en el rango de los lípidos polares (Fig. 43).

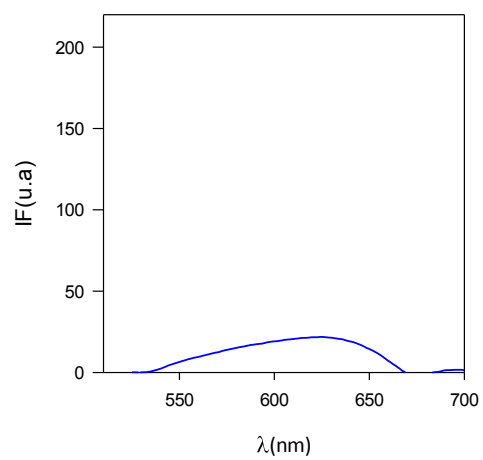
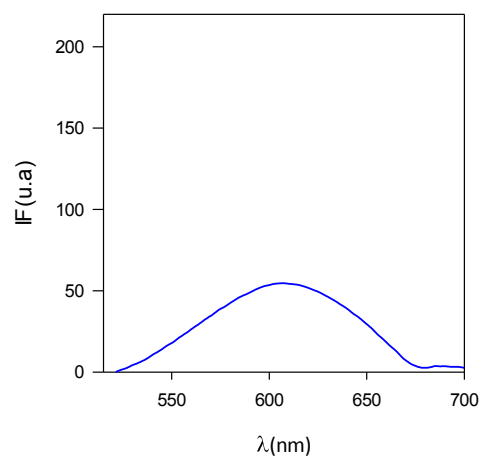
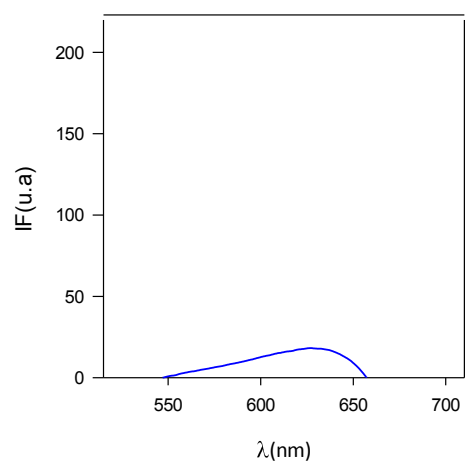


Fig. 43 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A1, A3 y A9 sin estrés.



En los resultados mostrados por las cepa A12, encontramos que generó un índice de fluorescencia de 24 unidades mayormente en el rango de los lípidos polares y solo una pequeña parte en el área de los lípidos neutros, mientras que la cepa A14 presentó una intensidad de 25 unidades también mayormente en el rango de los lípidos polares y una mínima parte en el rango de los neutros y la cepa A20 generó una intensidad de 19 unidades, también mayoritariamente en el área de los lípidos polares y una pequeña en el rango de los neutros (Fig. 44).

En el caso de la cepa A25, ésta mostró 24 unidades de índice de fluorescencia en el área de los lípidos polares principalmente, asimismo la cepa A29 presentó también 24 unidades de fluorescencia igualmente en el dominio del rango de los lípidos polares, mientras que la cepa A33 generó 32 unidades de índice de fluorescencia mayoritariamente en el área de los lípidos neutros (Fig. 45).

En la cepa A35 solo se generaron 17 unidades de fluorescencia, principalmente en el área de los lípidos polares, y la cepa A37 presentó 23 unidades, también en su mayoría en el rango de los lípidos polares, mientras que la cepa A38 mostró 25 unidades entre lípidos polares y neutros, pero principalmente polares (Fig. 46).

Los resultados mostrados por las cepa A40, encontramos que generó un índice de fluorescencia de 36 unidades entre lípidos polares y lípidos neutros, mientras que la cepa A44 presentó una intensidad de 22 unidades mayormente en el rango de los lípidos polares y una mínima parte en el rango de los neutros, sin embargo la cepa A43 generó una intensidad de 76.4 unidades de índice de fluorescencia, también entre lípidos polares y lípidos neutros (Fig. 47).

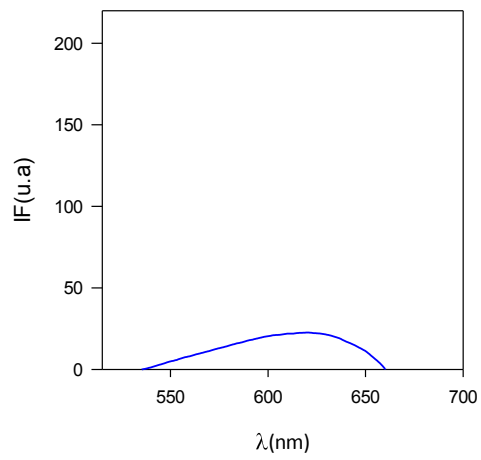
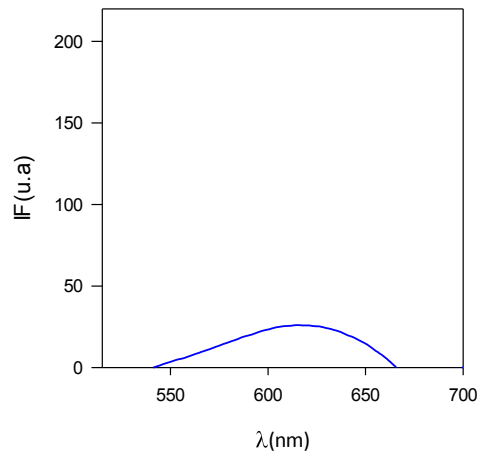
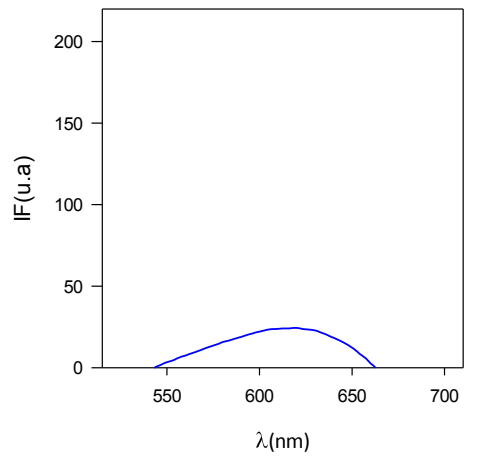


Fig. 44 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A12, A14 y A20 sin estrés

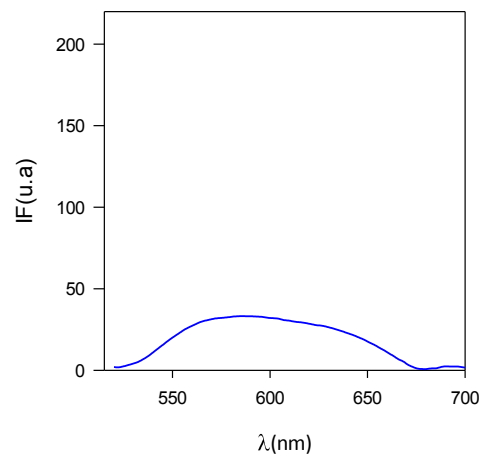
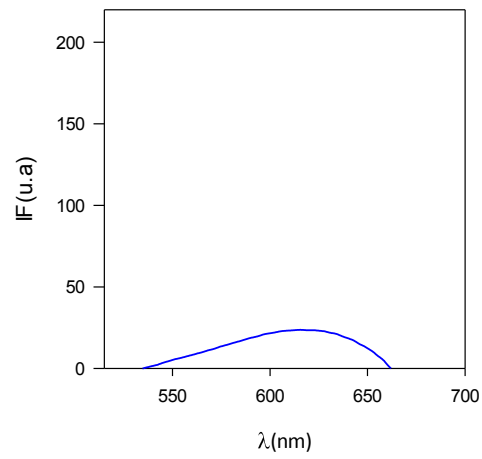
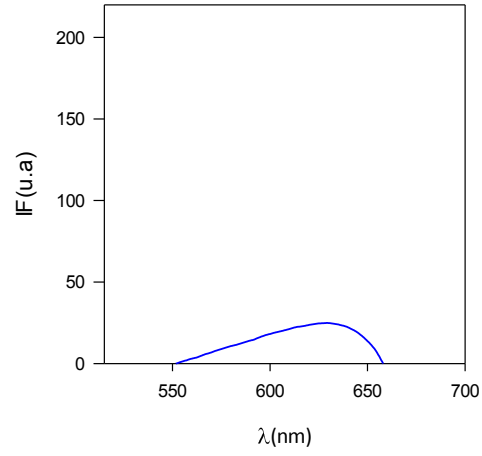


Fig. 45 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A25, A29 y A33 sin estrés

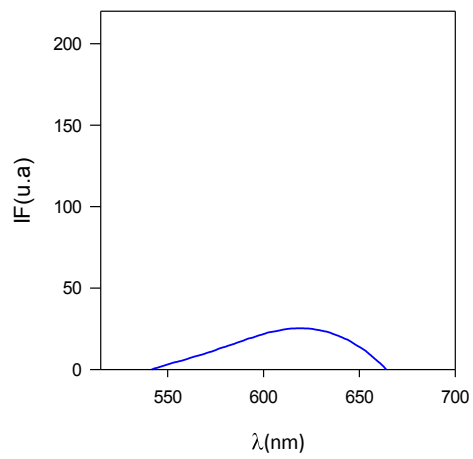
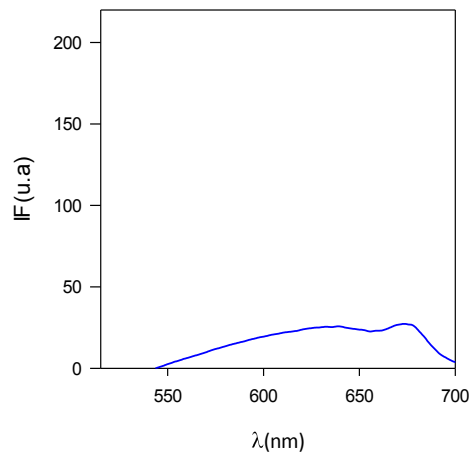
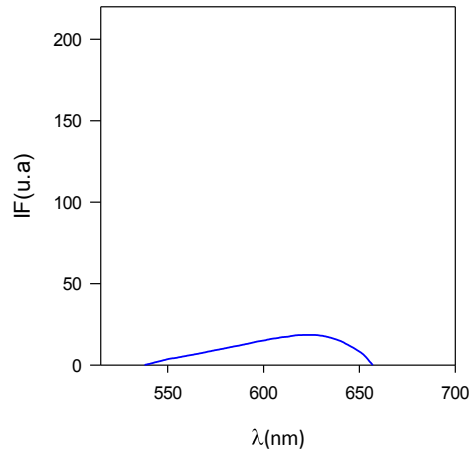


Fig. 46 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A35, A37 y A38 sin estrés

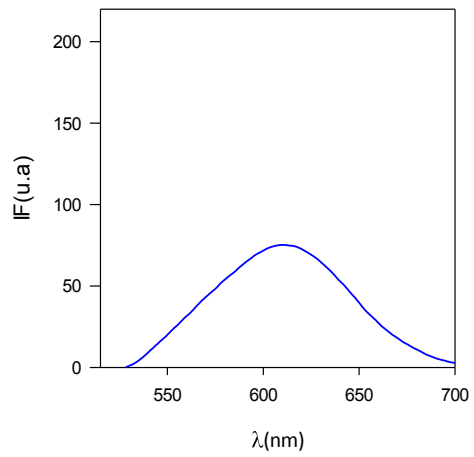
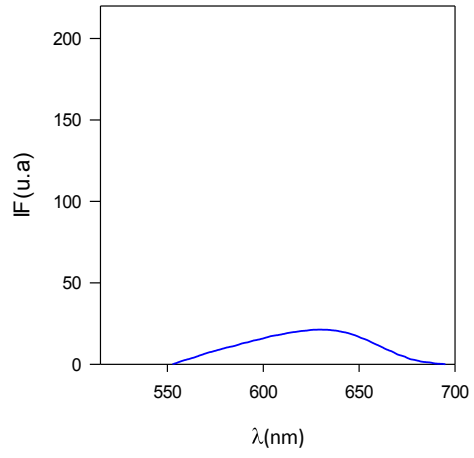
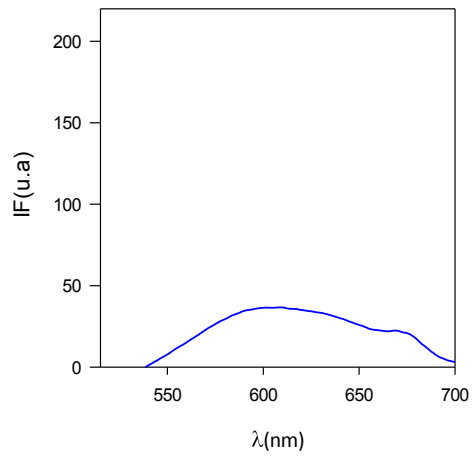


Fig. 47 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A40, A44 y A43 sin estrés

En los resultados mostrados por las cepa A46, encontramos que generó un índice de fluorescencia de 20 unidades mayormente en el rango de los lípidos polares y solo una mínima parte en el área de los lípidos neutros, mientras que la cepa A47 presentó también una intensidad de 20 unidades igualmente en el rango de los lípidos polares y una reducida parte en el rango de los neutros y la cepa A52 generó una intensidad de 32 unidades, entre lípidos polares y lípidos neutros sin embargo con mayor inclinación en el área de los lípidos polares (Fig. 48).

En los resultados mostrados por las cepa A54, encontramos que generó un índice de fluorescencia de 29 unidades mayormente en el rango de los lípidos polares y solo una parte en el área de los lípidos neutros, mientras que la cepa A58 presentó igualmente una intensidad de 28 unidades en el rango de los lípidos polares y una menor parte en el rango de los lípidos neutros y por último la cepa A61 que generó una intensidad de fluorescencia de 34 u.a., entre el rango de los lípidos polares y neutros (Fig. 49).

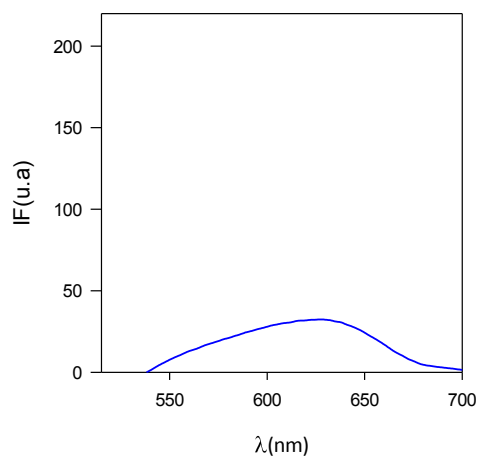
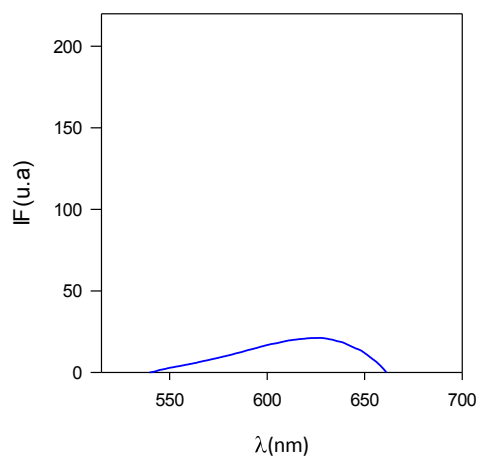
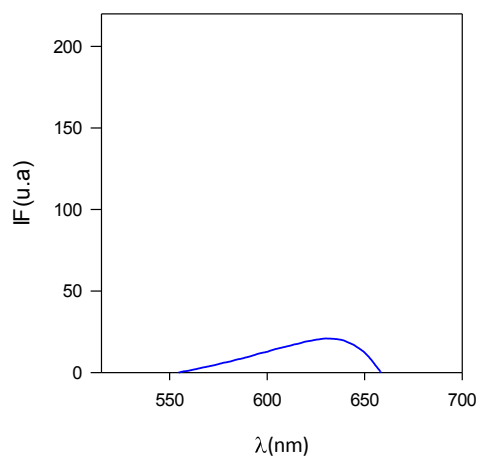


Fig. 48 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A46, A47 y A52 sin estrés

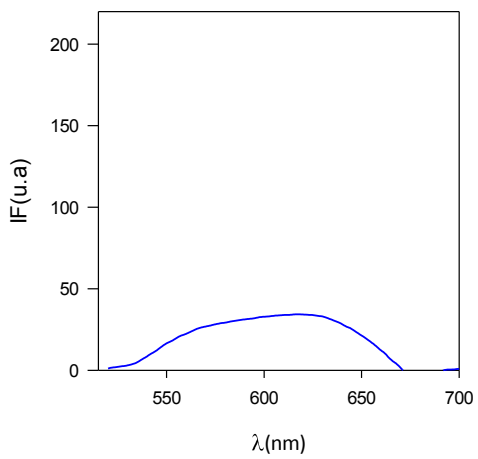
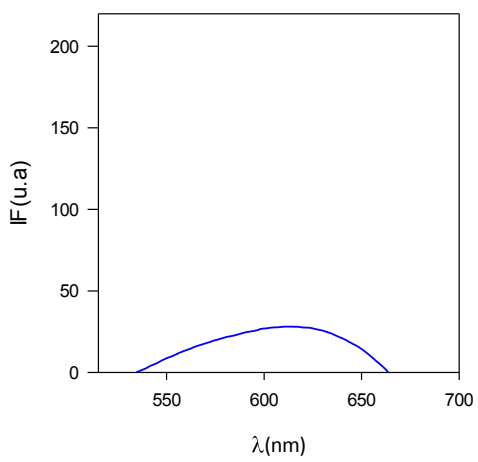
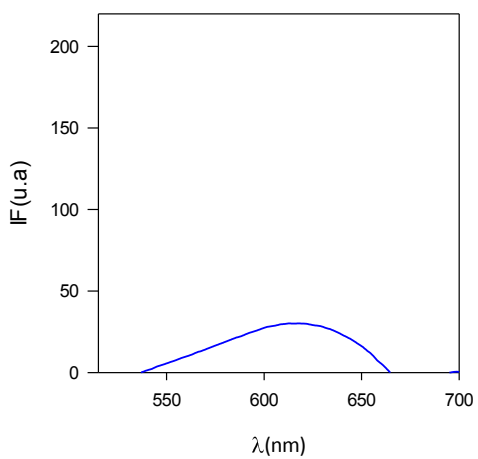


Fig. 49 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A54, A58 y A61 sin estrés



## 3.4. DISCUSIÓN

### 3.4.1. Evaluación del fotobiorreactor tipo Air lift

La producción masiva de biomasa microalgal sin duda tiene un costo económico mayor que la producción de otros recursos vegetales para producir biocombustibles (Chisti 2007). Alrededor del 90% de la producción comercial mundial de microalgas se hace a través de sistemas abiertos, debido al bajo costo (Van Beilen 2010). Sin embargo, los sistemas abiertos son menos favorables por proporcionar poco control frente a la contaminación por polvo o invasión de microorganismos (Tredici 2004).

En los sistemas cerrados o fotobiorreactores, pueden ser controlados parámetros como nutrientes, temperatura, CO<sub>2</sub> disuelto y pH (Chen et al. 2009), siendo en este sentido, la ventaja comparativa frente a los sistemas abiertos. A pesar de que los fotobiorreactores son más caros que los sistemas abiertos, son capaces de tener una mayor productividad por área de cultivo (Chisti 2007).

Debido a que un buen mezclado puede aumentar la productividad hasta 40% en un fotobiorreactor tubular (Ugwu et al. 2002), en éste trabajo se decidió por la opción de un sistema de mezcla de gases como el empleado en el sistema Air lift, ya que causa menos impacto que los fotobiorreactores de sistema mecánico, que pueden causar daños a la biomasa (Sánchez et al. 2003., Chisti 1999., Mazzuca et al. 2006). Debido a que en el sistema Air lift, la mezcla se alcanza por flujo de fluidos por burbujeo de aire dentro de un tubo central de subida, que luego se distribuye bajando por la parte exterior del tubo central, creando una circulación natural (Chisti y Jauregui-Haza 2002). Y que además, nos permitiera controlar los rangos de temperatura, intensidad de la luz, condiciones de mezclado y composición de nutrientes, ya que las diferentes especies tienen distintos requerimientos.

En este sentido, el diseño del fotobiorreactor Air lift cumplió con su propósito de llevar a cabo todos los experimentos de este trabajo, permitiendo controlar todos los parámetros diseñados en los experimentos, así como garantizar, gracias a su diseño, que

todas las células tuvieran la misma exposición a la luz, lograndose así una mayor productividad.

Actualmente, empresas líderes en el mundo como Algenol biofuels en USA y Subitec en Alemania, emplean el fundamento del sistema Air lift para la producción de sus fotobiorreactores.

### **3.4.2. Evaluación de crecimiento celular en medio bristol a diferentes temperaturas**

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que afectan el crecimiento y desarrollo de los organismos vivos. El crecimiento de las microalgas depende también de la temperatura, por lo que se requiere conocer un valor óptimo para una tasa máxima de crecimiento (Bhosale 2004). La temperatura también es importante para la disociación de las moléculas de carbono, haciéndolo disponible para la fotosíntesis (Kommareddy y Anderson 2003). La temperatura óptima para el cultivo de microalgas se encuentra generalmente entre los 20 y 24 °C, no obstante, estas pueden variar dependiendo del medio de cultivo, la especie y la cepa utilizada. Comúnmente, los cultivos de microalgas toleran temperaturas de entre 16 y 27 °C, en donde a temperaturas menores a 16 °C disminuyen el crecimiento, mientras que una temperatura mayor a los 35 °C resulta ser letal para un gran número de especies (Mehlitz 2009).

Los cambios en la temperatura también pueden causar alteraciones en muchas de las rutas metabólicas, incluyendo la biosíntesis de los carotenoides. Se han observado cambios en las características de *Chlorella zofingiensis* cuando se incrementó la temperatura, dando lugar a cambios en la eficiencia de absorción asociada a una variación en el tamaño celular y los niveles de pigmento (Martin 2010). De acuerdo a Del Campo y col. (2004), la acumulación celular de luteína y astaxantina en *Muriellopsis sp.* aumenta cuando es crecida a una temperatura mayor a 33 °C, sin embargo el nivel volumétrico se incrementó hasta seis veces más cuando la temperatura fue de 28 °C. A mayores temperaturas de crecimiento, la división celular se altera pero no la síntesis de proteínas. También se ha demostrado que algunas algas aumentan la acumulación de carotenoides a una temperatura de 40 °C en comparación con la tasa

obtenida a la temperatura óptima de crecimiento de 28 °C (Mosqueda-Cano y Gutiérrez-Corona 1995), asimismo se ha observado en muchas algas y cianobacterias que la insaturación de los ácidos grasos se incrementa cuando desciende la temperatura y viceversa, cuando la temperatura aumenta, aumenta la saturación de los ácidos grasos (Loera-Quezada y Olguín 2010).

Las condiciones óptimas de cultivo dependen de la especie de microalga, cepa, medios de crecimiento, y la geometría del fotobiorreactor (Sukenic et al. 1991; Acien Fernandez et al. 1997; Barbosa et al. 2003; Williams y Laurens 2010). Estas condiciones son únicas para cada sistema de cultivo, y sólo obtenidas experimentalmente pueden ser confiables (R. Kandilian et al. 2014).

Debido a lo anterior, como objetivo de éste trabajo se procedió a determinar las condiciones óptimas de crecimiento de las cepas de microalgas aisladas, encontrando que a una intensidad lumínica  $445 \mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a 25°C las cepas A12, A20, A14 y A38 son las que presentaron el mayor número de células por mililitro, con 28, 16.7, 13.5 y 9.1 Millones de cel/ml respectivamente, sin embargo, todas las cepas aisladas, presentaron un mayor crecimiento en comparación a la cepa de referencia *N. oleoabundans* y el 40% de las cepas aisladas (A3, A25, A29, A37, A46, A52, A54, A58 y A 61) desarrolló su máximo crecimiento en 14 días o menos, mientras que a 32°C fueron la A12, A33, A38 y A40 las que desarrollaron un crecimiento mas alto, con 19.4, 11.5, 11.7 y 14.4 Millones de cel/ml respectivamente, sin embargo, también a 32°C la mayoría de las cepas aisladas presentaron un crecimiento mas alto en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* con excepción de las cepas A20 y A58, asimismo, solo el 20% desarrolló su máximo crecimiento en 14 días o menos. Demostrandose en este trabajo, la condición óptima de cada cepa bajo este parámetro.

### **3.4.3. Evaluación de crecimiento celular en medio bristol a diferentes concentraciones de nitratos ( $\text{NaNO}_3$ ) y fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).**

Las algas requieren nutrimentos en disolución. Los nitratos y los fosfatos son dos nutrimentos de importancia, al igual que el sodio y los silicatos (Dan-Telah y col., 2004). Existen varios medios de cultivo formulados disponibles, pero los requerimientos son distintos para cada variedad de microalga. Por otra parte, se debe tomar en cuenta el objetivo del experimento para definir la composición del medio de cultivo. Por ejemplo, si la finalidad es una alta productividad de biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ ), altas concentraciones de nitratos y fosfatos son esenciales para el crecimiento (García-Malea et al. 2006).

Para inducir la producción de metabolitos y compuestos de interés comercial, la manipulación en la concentración de nitratos es una técnica común para simular un ambiente de estrés en la microalga. Esto sugiere que una alta relación de carbono nitrógeno (C/N) resulta ser eficiente para inducir la biosíntesis de astaxantina, un carotenoide de interés comercial (Chen y John 1991; Chen y Chen 2006). La limitación de nitrógeno en presencia de un exceso de fuentes orgánicas de carbono, como acetato y glucosa, ha sido efectiva en la producción de carotenoides en cultivos mixotróficos (Ip y Chen 2005).

Varios estudios recientes han descrito las condiciones de crecimiento que se pueden utilizar para la escala industrial en marcha de la producción de lípidos de las algas. El proceso de dos etapas sugerido por Rodolfi et al. (2009) alcanzaron  $0.2 \text{ kg} / \text{m}^3 / \text{d}$  de aceite de microalgas por vía fotosintética. En esta configuración, las células se cultivaron primero en condiciones de nutrientes suficientes para la acumulación de biomasa seguida de privación de nutrientes para la síntesis de lípidos. Sin embargo, un estudio realizado por (Stephenson et al. 2010) encontró que la estrategia más eficaz para lograr un alto contenido de lípidos en *C. vulgaris* fue permitir que las células agotaran su  $\text{N}_2$  naturalmente, en lugar de transferirlas a un medio que carece completamente de  $\text{N}_2$  (Scott et al 2010).

En este trabajo se lograron determinar las condiciones óptimas de crecimiento, a distintas concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  1.47, 2.94 y 14.71 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642, 1.28 y

6.42mMol a 25 y 32°C de las diferentes cepas de microalgas, sobresaliendo las cepas A43 y A33 a 25°C superando a la cepa de referencia *N. oleoabundans* en cuanto al crecimiento; y las cepas A4, A12, A14, A33 y A43 que también superaron a la cepa de referencia *N. oleoabundans* pero ahora a 32°C

#### **3.4.4. Evaluación de crecimiento celular en medio bristol a diferentes intensidades de luz (90,445 y 490 $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$ ).**

La intensidad de la luz es uno de los factores más importantes para el crecimiento fotosintético de las microalgas. Los sistemas de cultivos de microalgas pueden ser iluminados por luz artificial, luz solar o ambas (Chisti, 2007).

Para que la luz artificial sea de utilidad en el proceso fotosintético de las microalgas, los fotones generados deben encontrarse a una longitud de onda de entre los 600 y 700 nm. La tasa específica de crecimiento de las microalgas depende de la intensidad de la luz. El crecimiento de las microalgas se incrementa conforme la intensidad de luz aumenta. Cuando la tasa de crecimiento llega a su punto máximo, ésta disminuye con el incremento de la intensidad de la luz debido a la fotoinhibición (Bohne y Linden 2002). Este patrón de crecimiento en relación con la intensidad de la luz se observa en la mayoría las especies de microalgas (Fábregas et al. 1998). Se ha reportado que la producción y acumulación de metabolitos de interés comercial se ve afectada por la radiación de luz blanca en algas, hongos y bacterias (Martin 2010). Sin embargo, la intensidad y el régimen de la iluminación varían con el género de microalga.

Fábregas y col. (1998) estudiaron el efecto de la intensidad de la luz en la a microalga *Haematococcus pluvialis*, observando que a una intensidad de 230  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  la acumulación de astaxantina fue mayor en comparación a la observada con una intensidad de 40  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . De igual manera, Barbosa y col. (2004) mostraron un remarcado incremento en la concentración de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* cuando se incrementó la intensidad de luz de 50 a 400  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La fotoinhibición es un proceso dependiente del tiempo, en el cual ocurre un daño

irreversible pocos minutos después de iniciado el estrés por luz, con un daño que excede el 50 % después de 10 o 20 minutos (Pulz 2001). Sin embargo, se han encontrado pocas referencias disponibles acerca de la fotoadaptación, la inhibición por luz o efectos de saturación en fotobiorreactores.

En base a esto se buscó determinar las condiciones óptimas de luz con valores de intensidad lumínica de 90, 445 y 490  $\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ . Los cultivos fueron iluminados en ciclos de luz-oscuridad en el rango de 12:12 con lámparas fluorescentes (Tecno Lite T4 20W/65) por 26 días. Observándose que la cepa A46 a mayor intensidad de luz mayor producción celular presentando 2.1 millones de cel/ml a una intensidad de 90  $\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  con 445  $\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  generó 5.3 millones y a 490  $\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  10 millones de cel/ml sin embargo a 490  $\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  pero a 32°C cayó a 1.6 millones de cel/ml. Por otro lado la cepa A43a 25°C se comportó de manera diferente, a 445 y 490  $\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  generó prácticamente la misma cantidad de células (5.8 millones cel/mL), pero a 90 presentó un incremento llegando a 10 millones de cel/mL Sin embargo a 32°C incrementó su cantidad de celular y tuvo un comportamiento que a mayor intensidad de luz mayor generación de células llegando hasta los 16 millones de cel/mL a los 490  $\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ; por otro lado, la cepa A35 se comportó de manera totalmente diferente, ya que a menor incidencia de luz (90  $\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ) generó una mayor cantidad de biomasa (13.7 millones cel/mL) y por consiguiente a mayor intensidad de luz menor cantidad de células, esta característica de crecimiento óptimo, podría ser muy interesante debido a que resultaría en un ahorro muy importante en el consumo de energía lumínica en un proceso a nivel comercial y/o industrial.

#### **3.4.5. Evaluación de lípidos neutros en cepas sin estrés a 25°C**

Los principales indicadores que determinan el potencial de una microalga para producción de biodiesel son el crecimiento, el contenido de lípidos, el perfil y la productividad de los mismos (Gong y Jiang 2011). Este último parámetro determina el costo del proceso de cultivo, Por lo tanto, un proceso ideal debería permitir la producción de lípidos a la más alta productividad celular, con el contenido más alto posible en las células (Li et al. 2008). En general, en condiciones óptimas de crecimiento las algas producen

predominantemente lípidos polares (Chisti 2007). Sin embargo, cuando las microalgas se someten a condiciones de estrés impuestas por estímulos ambientales químicos y físicos, solos o en combinación, ocurre síntesis y acumulación de grandes cantidades de triglicéridos, acompañada por considerables alteraciones en la composición de los lípidos y ácidos grasos.

El colorante Rojo Nilo es una prometedora tinción fluorescente para una rápida cuantificación de lípidos celulares. Se utilizó en las cepas de microalgas seleccionadas previamente con el colorante Sudan IV, y demostró ser eficaz en varias cepas de microalgas y es utilizada como medida para detectar las condiciones de cultivo óptimo para la acumulación de lípidos en las células, debido a que es conveniente y sensible, el Rojo Nilo ha sido aplicado con éxito en la determinación del contenido de lípidos celular de microalgas. En comparación con el método gravimétrico tradicional que toma por lo menos cinco días, el método de Rojo Nilo toma sólo dos días a partir de células de algas frescas. En segundo lugar, la medición de fluorescencia es sensible para la cuantificación de lípidos y puede distinguir diferencia 0.1% de contenido de lípidos. En tercer lugar, se requiere al menos 10 mg de biomasa de microalgas en la determinación gravimétrica, mientras que sólo se necesita 0.2 mg de biomasa de microalga en el método del Rojo Nilo. Por lo tanto, la medición de fluorescencia es un buen método alternativo para determinar los lípidos celulares en comparación con la gravimetría tradicional (Huang et al. 2009).

Primeramente, el objetivo que se perseguía en ésta etapa del trabajo era determinar los lípidos neutros, en las cepas seleccionadas sin estrés, llevándose a cabo mediante la sonda fluorescente Rojo Nilo, encontrándose que cuando las cepas estuvieron en ausencia de estrés, solo 6 cepas (A3, A33, A40, A43, A58, A61 ) de las 23 seleccionadas y la cepa de referencia *N. oleabundans*, presentaron lípidos neutros, mientras que el resto de las cepas aisladas presentaba lípidos polares, mismos que eran producidos en pequeñas cantidades, por lo tanto se debían establecer métodos para redirigir los flujos metabólicos a la acumulación de lípidos, estableciendo condiciones de estrés fisiológico, en capítulos más adelante de este trabajo.

### 3.5. CONCLUSIÓN

El diseño del fotobiorreactor Air lift cumplió con la expectativa de presentar una mezcla adecuada debido al flujo de fluidos por burbujeo de aire dentro de un canal central de ascenso, que luego se distribuye bajando por la parte exterior del tubo central, creando una circulación natural, permitiendo además, controlar los rangos de temperatura, intensidad de la luz, condiciones de mezclado y composición de nutrientes.

En este sentido, se cumplió con el propósito de llevar a cabo todos los experimentos de este trabajo, permitiendo controlar todos los parámetros diseñados en los experimentos, así como garantizar, gracias a su diseño, que todas las células tuvieran la misma exposición a la luz, lograndose así la mayor productividad posible.

Finalmente, se lograron determinar las condiciones óptimas de crecimiento, de cada una de las cepas seleccionadas, permitiendo probar sin problema, distintos parámetros a las diferentes especies de microalgas y lograr comparar los resultados con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185.



### **DETERMINACIÓN DE CONDICIONES ÓPTIMAS DE ESTRÉS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS NEUTROS.**

#### **4.1. INTRODUCCIÓN**

Los principales indicadores que determinan el potencial de una microalga para producción de biodiesel son el crecimiento, el contenido de lípidos, el perfil y la productividad de los mismos (Gong y Jiang 2011).

Este último parámetro determina el costo del proceso de cultivo; por lo tanto, un proceso ideal debería permitir la producción de lípidos a la más alta productividad celular, con el contenido más alto posible en las células (Li et al. 2008).

Los lípidos son una materia prima muy atractiva para a producción de biocombustibles debido a su densidad altamente energética y fácil actualización a biodiesel. Los lípidos se clasifican generalmente en dos grupos principales: lípidos polares y neutros. Los lípidos polares (hidrofílicos) se componen principalmente de ácidos grasos libres, glicolípidos y fosfolípidos. Los lípidos neutros (lipofílicos) consisten principalmente en triglicéridos (TAG) pero también incluyen monoacilglicerol, diacilglicerol y esteroides. En general, en condiciones óptimas de crecimiento las algas producen predominantemente lípidos polares (Chisti 2007).

Sin embargo cuando las microalgas se someten a condiciones de estrés impuestas por estímulos ambientales químicos y físicos, solos o en combinación, ocurre síntesis y

acumulación de grandes cantidades de triglicéridos, acompañada por considerables alteraciones en la composición de los lípidos y ácidos grasos.

Por lo tanto se deben establecer métodos para redirigirlos flujos metabólicos a la acumulación de lípidos, estableciendo condiciones de estrés fisiológico como privación de nutrientes, cambio de temperatura, aumento de la salinidad (Chisti 2013) e intensidad de iluminación (Cornet y Dussap 2009; Chen et al. 2011; Takache et al. 2012).

Además de estos factores, la fase de crecimiento y la edad del cultivo también afectan al contenido y composición de los ácidos grasos, observándose un mayor contenido de lípidos en la fase estacionaria con respecto a la fase logarítmica (Spolaore et al. 2006; Hu et al. 2008).

De hecho, las condiciones óptimas de cultivo dependen de la especie de microalga, cepa, medios de crecimiento, y la geometría del fotobiorreactor (Sukenic et al. 1991; Acien Fernandez et al. 1997; Barbosa et al. 2003; Williams y Laurens 2010). Estas condiciones son únicas para cada sistema de cultivo y sólo obtenidas experimentalmente pueden ser confiables (R. Kandilian et al. 2014).

## 4.2. METODOLOGÍA

### 4.2.1. Contenido de lípidos neutros (método fluorumétrico)

Sé determinó la cantidad de lípidos neutros mediante la sonda fluorescente Rojo Nilo, en todas las cepas previamente inoculadas en los fotobiorreactores bajo distintas condiciones de estrés. Para realizar las medidas de intensidad de fluorescencia fue necesario ajustar el cultivo de microalgas a una densidad óptica de 0.25 de absorbancia para posteriormente colocar 1.2ml de cada una de las muestras y añadir 3 $\mu$ l de una solución estándar de Rojo nilo (9-dietilamino-5H-benzo [ $\alpha$ ] fenoxazina-5-uno. Sigma–Aldrich) 0.25mg/ml diluido en acetona al 50%.

Las suspensiones se analizaron en un espectrofluorómetro (Perkin-Elmer LS-45) utilizando una cubeta de 0.2cm de paso óptico, y se aplicaron las siguientes condiciones: anchura de la rendijade excitación: 10nm, anchura de la rendija de emisión: 10nm, los espectros fueron registrados desde 500nm hasta 750nm con una velocidad de barrido de 1nm/sec empleando una longitud de onda de excitación de 490nm. La intensidad relativa de fluorescencia se logró después de la sustracción de autofluorescencia del alga y la autofluorescencia del Rojo Nilo.

Todas las medidas se hicieron por triplicado en experimentos independientes.

### 4.2.2. Experimento de luz

Las cepas de microalgas seleccionadas, fueron puestas en estrés en un fotobiorreactor Air lift con una capacidad de 2.3 lts., con burbujeo continuo (flujo de volumen de aire 9.4 L/h) en medio Bristol. Los valores de intensidad lumínica fueron 90, 445 y 490  $\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$ . Los cultivos fueron iluminados en ciclos de luz-oscuridad en el rango de 12:12 con lámparas fluorescentes (Tecno Lite T4 20W/65) por 26 días. A fin de lograr los parámetros de estrés óptimos, para la incrementación de lípidos neutros.

### **4.2.3. Experimento de Temperatura**

Para este experimento se utilizó un termostato sumergible (Dolphin HT-1300). Después de ser inoculados los fotobiorreactores Air lift con las microalgas de prueba seleccionadas, éstos fueron puestos a 2 diferentes temperaturas de 25 y 32 °C. Para determinar los valores de estrés óptimos, que incrementaran la cantidad de lípidos neutros contenidos en el interior de su célula.

### **4.2.4. Experimento de Nutrientes**

Para determinar las condiciones óptimas de estrés e incrementar la producción lipídica (lípidos neutros) en base a la cantidad de Nitrato, se probaron 3 diferentes concentraciones  $\text{NaNO}_3$  (1.47, 2.94 y 14.71mMol), en los fotobiorreactores inoculados con las microalgas seleccionadas. Creciendo cada cultivo a una tasa de crecimiento en particular.

Del mismo modo sucedió para determinar las condiciones óptimas de estrés en base a la cantidad de fosfato, el cual se estudió variando la cantidad de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 3 concentraciones distintas (0.642, 1.28 y 6.42mMol). La mayor cantidad de lípido determinó la cantidad óptima de cada parámetro en particular.

### 4.3. RESULTADOS

Cuando las microalgas se encuentran en condiciones de crecimiento normales, es decir, en un ambiente estable, tienden a producir una mayor cantidad de clorofila que de lípidos, sin embargo, cuando son expuestas a condiciones de estrés (ej. cambios de temperatura, incremento o disminución de nutrientes e incluso variación en la intensidad lumínica) las microalgas disminuyen su producción de clorofila y por el contrario comienzan a incrementar la cantidad de lípidos de manera importante, como una manera de protección a los cambios ambientales; como en la cepa aislada A4 que presenta una alta cantidad de lípidos neutros al estar en condiciones de estrés y en cambio una alta cantidad de clorofila al estar en un ambiente estable (fig. 50).

EFFECTO DEL ESTRÉS EN PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS IBL2-4

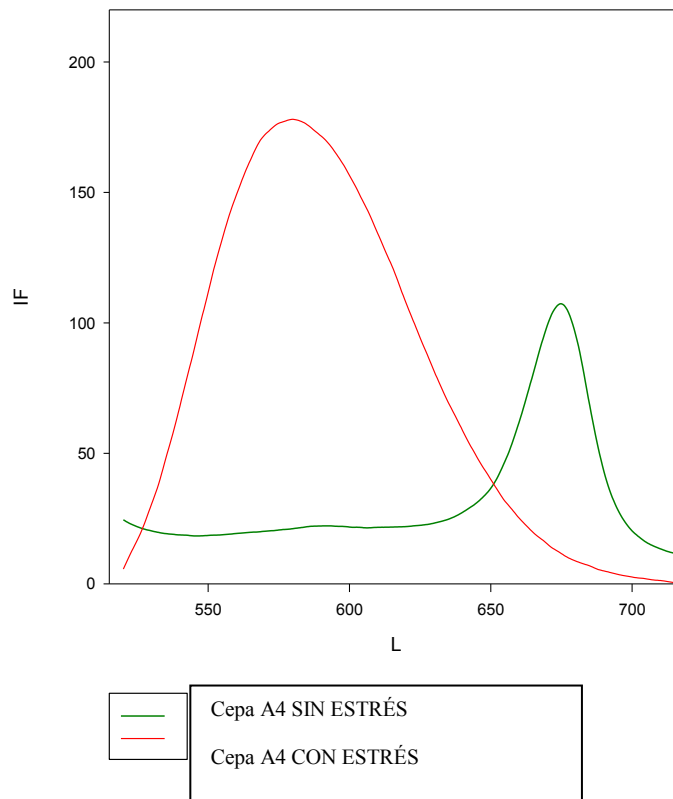


Fig. 50 Cepa aislada A4 en condiciones óptimas de crecimiento sin estrés (línea verde) con alta producción de clorofila y baja producción de lípidos., mientras que bajo condiciones de estrés, presenta una alta producción de lípidos y una muy baja producción de clorofila (línea roja).

### 4.3.1. Efecto del Nivel de Luz y Temperatura sobre el Contenido Lipídico

#### 4.3.1.1. Nivel de luz de $445\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$ a 25 y 32°C

En este experimento la cepa A9 logró incrementar en un 117.3% la cantidad de lípidos, al ponerse a crecer bajo condiciones de estrés (intensidad lumínica de  $445\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a 25°C) detectándose en el espectrofluorofotómetro 50 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 23 unidades producidas en ausencia de estrés, asimismo, presento un mayor porcentaje de lípidos en un 150% principalmente en el rango de los lípidos neutros en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares, bajo estas condiciones las células disminuyeron la cantidad de lípidos polares e incrementaron ampliamente la producción de lípidos neutros; por otro lado, la cepa A1 incrementó la cantidad de lípidos en un 140% pasando de 15 unidades con las células creciendo en ausencia de estrés a 36 unidades de índice de fluorescencia bajo el mismo estrés, asimismo, presentó un mayor porcentaje de lípidos en un 80% principalmente en el rango de los lípidos neutros en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares; sin embargo la cepa A3 se vió negativamente afectada al ponerse a las mismas condiciones de estrés ya que no solo disminuyo la cantidad de lípidos en un 57.6% sino que además redujo la cantidad de lípidos neutros e incremento notablemente los lípidos polares pasando de 52 unidades sin estrés a 22 unidades de índice de fluorescencia bajo estrés, asimismo, presentó un mayor porcentaje de lípidos en un 10% principalmente en el rango de los lípidos polares en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia también en el rango de los lípidos polares (fig. 51).

En este experimento la cepa A12 se vió negativamente afectada al ponerse a las mismas condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a 25°C), disminuyendo la cantidad de lípidos en un 20.8% dentro del rango de los lípidos polares pasando de 24 unidades sin estrés a 19 unidades de índice de fluorescencia bajo estrés, asimismo, presentó un menor porcentaje de lípidos en un 5% principalmente en el rango de los lípidos polares en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia principalmente también en el rango de los lípidos polares, por otro lado la cepa A14 también disminuyó la cantidad de lípidos en un 20% pasando de 25 unidades con las células creciendo en ausencia de estrés a 20 unidades de índice de fluorescencia bajo estrés, asimismo, presentó la misma cantidad de lípidos polares en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares también; sin embargo la cepa A20 incrementó la cantidad de lípidos en un 36.8% pasando de 19 unidades con las células creciendo en ausencia de estrés a 26 unidades de índice de fluorescencia bajo el mismo estrés, asimismo, presentó un mayor porcentaje de lípidos en un 30% principalmente en el rango de los lípidos polares en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares, cabe mencionar que en comparación con la cepa A20 sin estrés, se disminuyó la cantidad de lípidos polares e incrementó ligeramente la producción de lípidos neutros (Fig. 52).

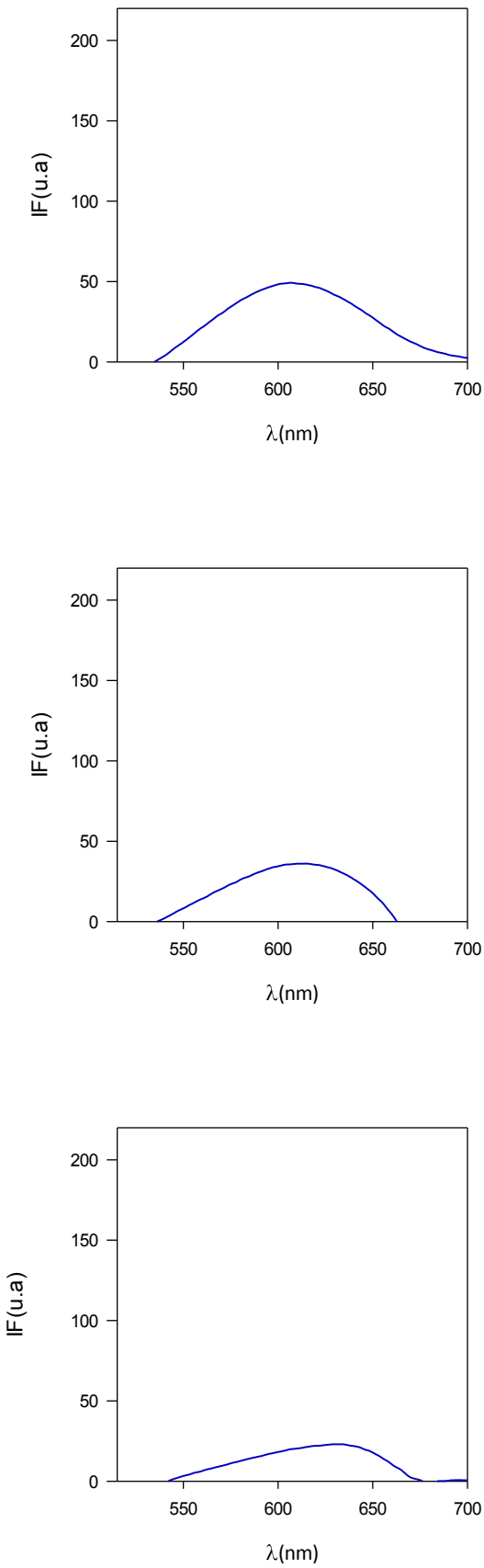


Fig. 51 Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A9, A1 y A3 en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$ )



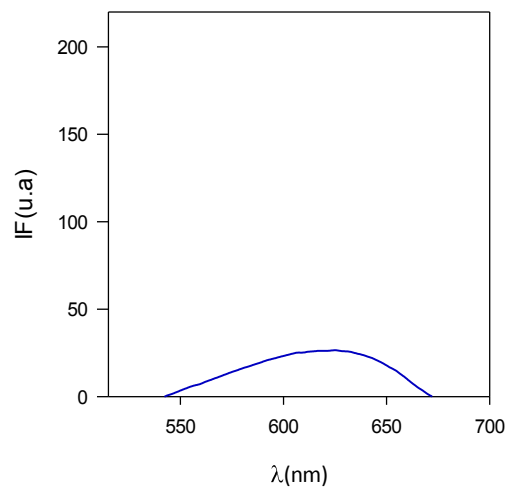
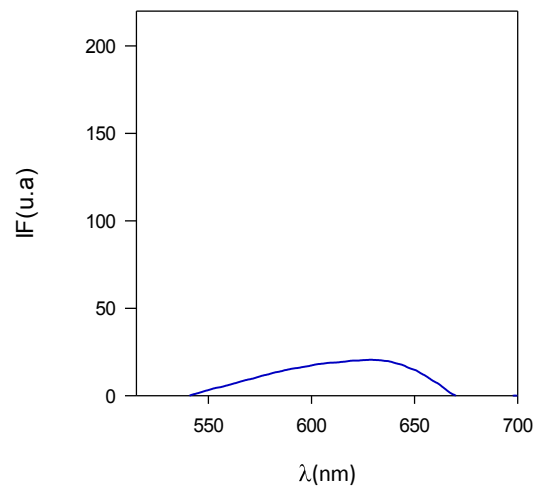
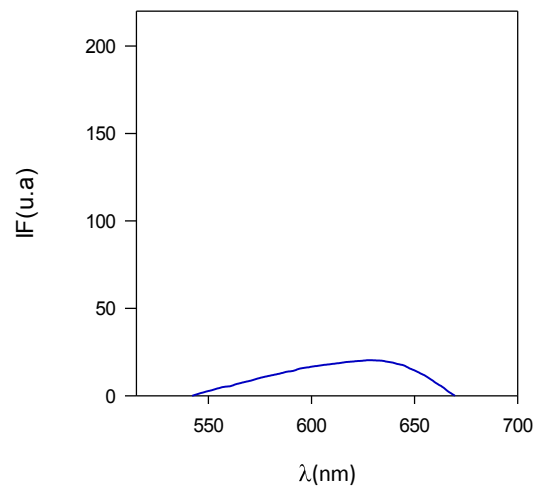


Fig. 52 Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A12, A14 y A20 en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$ )

En este experimento la cepa A35 logró incrementar en un 111.7% la cantidad de lípidos, al ponerse a crecer bajo condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$  detectándose en el espectrofluorofotómetro 36 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 17 unidades producidas en ausencia de estrés, además, las células disminuyeron la cantidad de lípidos polares e incrementaron ampliamente la producción de lípidos neutros, asimismo, presentó un mayor porcentaje de lípidos en un 80% principalmente en el rango de los lípidos neutros en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares; por otro lado la cepa A29 incrementó la cantidad de lípidos en un 4.1% pasando de 24 unidades con las células creciendo en ausencia de estrés a 25 unidades de índice de fluorescencia bajo el mismo estrés además de que disminuyó la cantidad de lípidos polares e incrementó ligeramente la producción de lípidos neutros, asimismo, presentó un mayor porcentaje de lípidos en un 25% principalmente en el rango de los lípidos polares en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares; sin embargo la cepa A37 se vió negativamente afectada al ponerse a las mismas condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$ , disminuyendo la cantidad de lípidos en un 17.3% dentro del rango de los lípidos polares pasando de 23 unidades sin estrés a 19 unidades de índice de fluorescencia bajo estrés, además, presentó un menor porcentaje de lípidos en un 5% principalmente en el rango de los lípidos polares en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares (Fig. 53).

En este experimento la cepa A38 logró incrementar solo en un 4% la cantidad de lípidos, al ponerse a crecer bajo condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$  detectándose en el espectrofluorofotómetro 26 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 25 unidades producidas en ausencia de estrés, además, las células

disminuyeron la cantidad de lípidos polares e incrementaron ligeramente la producción de lípidos neutros, asimismo, presentó un mayor porcentaje de lípidos en un 30% principalmente en el rango de los lípidos polares en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el mismo rango de lípidos polares; por otro lado la cepa A47 no mostró ningún cambio manteniendo la misma cantidad de unidades de índice de fluorescencia (20) tanto en presencia como en ausencia de estrés y además se mantuvo dentro del rango de los lípidos polares, asimismo, presentó la misma cantidad de unidades que la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares; sin embargo la cepa A52 logró incrementar en un 137.5% la cantidad de lípidos, al ponerse a crecer bajo condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$  detectándose en el espectrofluorofotómetro 76 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 32 unidades producidas en ausencia de estrés, además, las células disminuyeron la cantidad de lípidos polares e incrementaron ampliamente la producción de lípidos neutros, asimismo, presentó un mayor porcentaje de lípidos en un 280% principalmente en el rango de los lípidos neutros en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares (Fig. 54).

En este experimento la cepa A54 logró incrementar en un 89.6% la cantidad de lípidos, al ponerse a crecer bajo condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$  detectándose en el espectrofluorofotómetro 55 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 29 unidades producidas en ausencia de estrés, además, las células disminuyeron la cantidad de lípidos polares e incrementaron ampliamente la producción de lípidos neutros, asimismo, presentó un mayor porcentaje de lípidos en un 175% principalmente en el rango de los lípidos neutros en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los

lípidos polares; por otro lado la cepa A43 disminuyó la cantidad de lípidos en un 32.8% pasando de 76 unidades con las células creciendo en ausencia de estrés a 51 unidades de índice de fluorescencia bajo estrés; sin embargo los ácidos grasos producidos se mantuvieron dentro del rango de los lípidos neutros, asimismo, presentó un mayor porcentaje de lípidos en un 155% principalmente en el rango de los lípidos neutros en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares; por otro lado la cepa A4 generó 31 unidades de índice de fluorescencia bajo condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$ , dentro del rango de los lípidos polares y neutros, asimismo, presentó un mayor porcentaje de lípidos en un 55% principalmente en el rango de los lípidos polares en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia principalmente también en el rango de los lípidos polares (Fig. 55).

En este experimento la cepa A33 se vio negativamente afectada al ponerse a las mismas condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$ , disminuyendo la cantidad de lípidos en un 37.5% pasando de 32 unidades sin estrés a 20 unidades de índice de fluorescencia bajo estrés, provocando también una amplia disminución en la cantidad de lípidos neutros y un incremento en la producción de lípidos polares, asimismo, presentó la misma cantidad de lípidos en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares; por otro lado, la cepa A58 incrementó la cantidad de lípidos en un 64.2% pasando de 28 unidades con las células creciendo en ausencia de estrés a 46 unidades de índice de fluorescencia bajo estrés; sin embargo disminuyó ligeramente la cantidad de lípidos neutros e incrementó un poco la producción de lípidos polares, asimismo, presentó un mayor porcentaje de lípidos en un 130% principalmente en el rango de los lípidos polares en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia igualmente en el rango de los lípidos

polares; por otro lado, la cepa A61 se vió negativamente afectada al ponerse a las mismas condiciones de estrés ya que no solo disminuyo la cantidad de lípidos en un 44.1% sino que además redujo la cantidad de lípidos neutros e incremento notablemente los lípidos polares pasando de 34 unidades sin estrés a 19 unidades de índice de fluorescencia bajo estrés, asimismo, presentó un menor porcentaje de lípidos en un 5% principalmente en el rango de los lípidos polares en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares(Fig. 56).

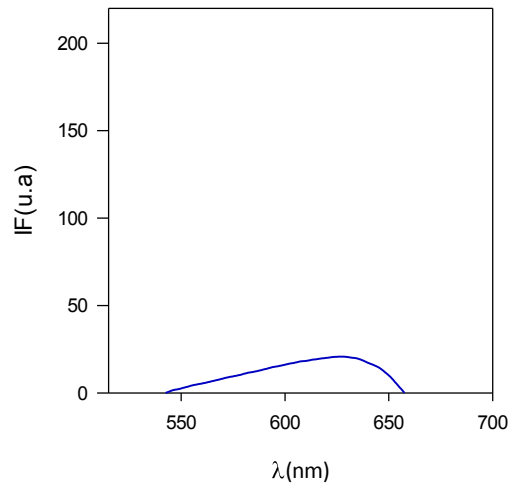
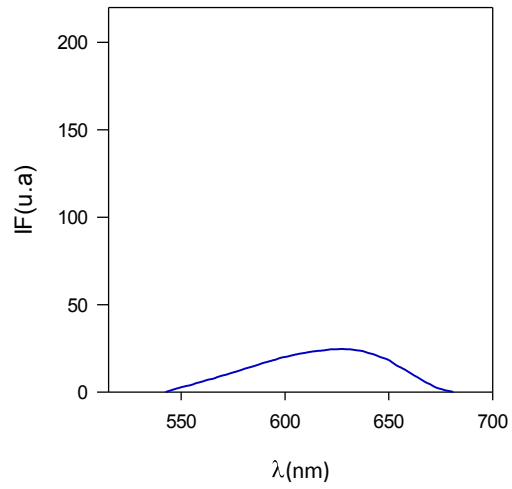
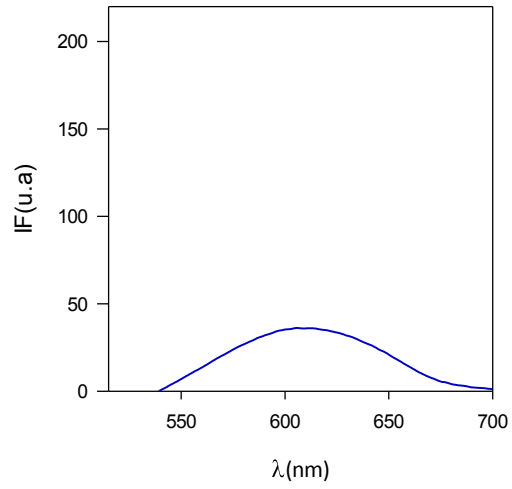


Fig. 53 Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A35, A29 y A37 en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$ )

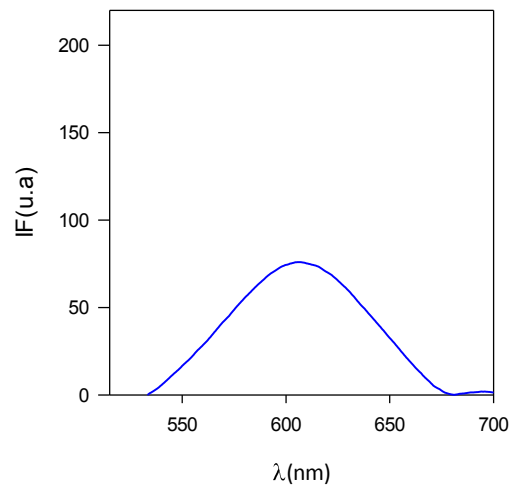
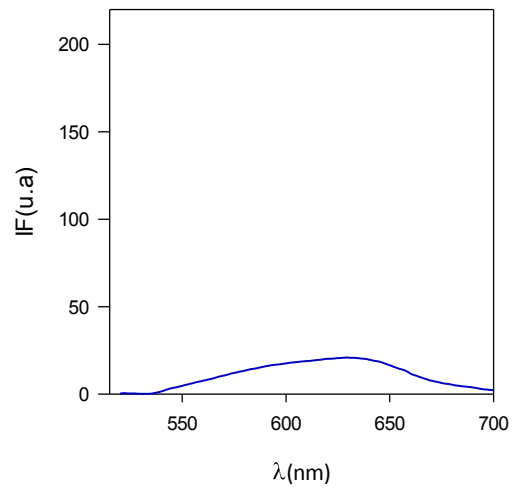
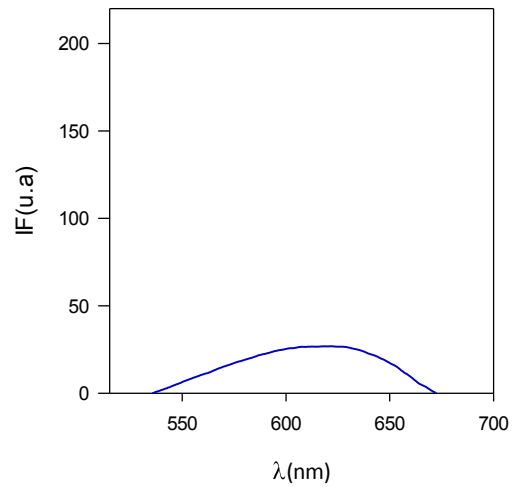


Fig. 54 Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A38, A47 y A52 en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$ )

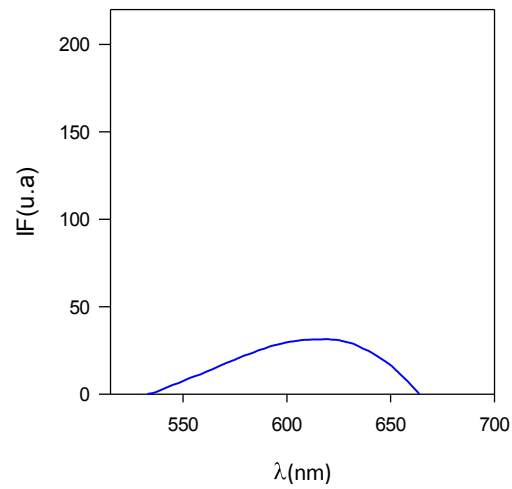
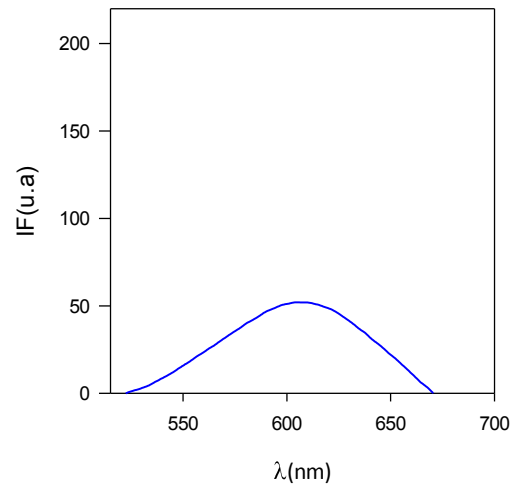
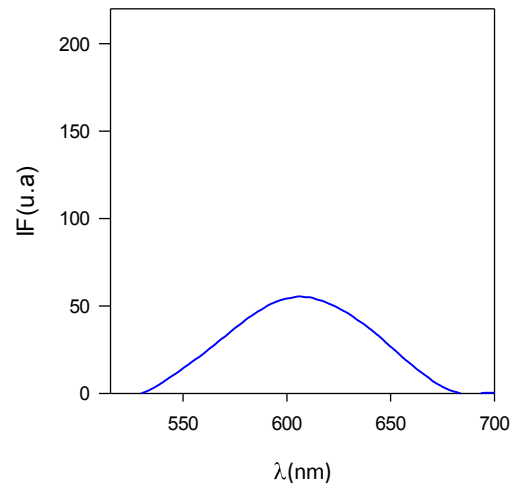


Fig. 55 Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A54, A43 y A4 en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$ )



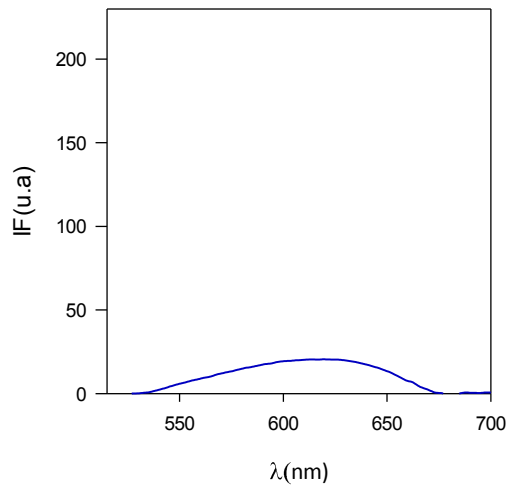
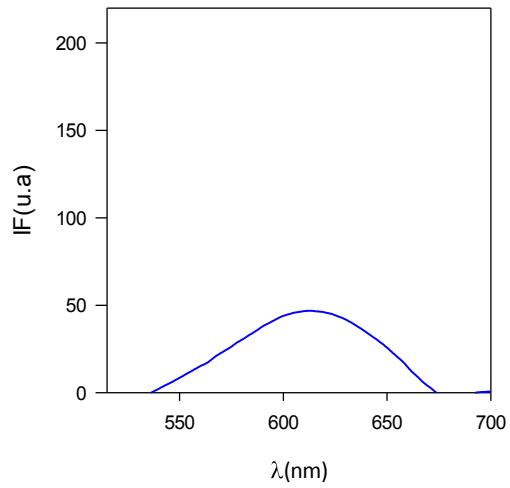
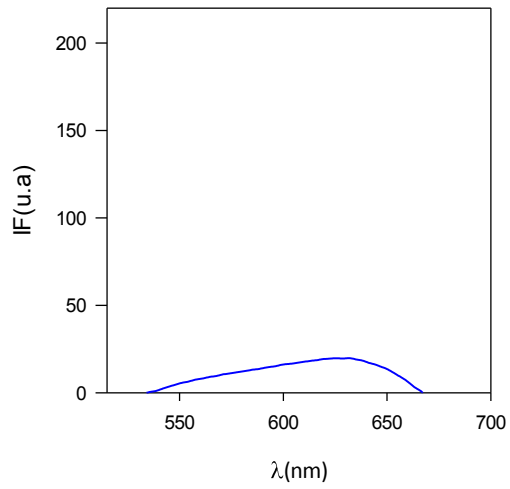


Fig. 56 Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A33, A58 y *N. oleoabundans* UTEX 1185 en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$ )

En este experimento la cepa A25 logró incrementar en un 75% la cantidad de lípidos, al ponerse a crecer bajo condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$  detectándose en el espectrofluorofotómetro 42 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 24 unidades producidas en ausencia de estrés, además, las células disminuyeron la cantidad de lípidos polares e incrementaron la producción de lípidos neutros, asimismo, presentó un mayor porcentaje de lípidos en un 110% principalmente en el rango de los lípidos polares en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares; también la cepa A40 incrementó la cantidad de lípidos en un 16.6% pasando de 36 unidades con las células creciendo en ausencia de estrés a 42 unidades de índice de fluorescencia bajo el mismo estrés; sin embargo disminuyó ligeramente la cantidad de lípidos neutros e incrementó un poco la producción de lípidos polares, al igual que la cepa anterior, presentó un mayor porcentaje de lípidos en un 110% también en el rango de los lípidos neutros en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia en el rango de los lípidos polares; la cepa A46 incrementó la cantidad de lípidos en un 15% pasando de 20 unidades con las células creciendo en ausencia de estrés a 23 unidades de índice de fluorescencia bajo el mismo estrés; sin embargo se mantuvo dentro del rango de los lípidos polares, asimismo, presentó un mayor porcentaje de lípidos en un 15% principalmente en el rango de los lípidos polares en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 20 unidades de índice de fluorescencia también en el rango de los lípidos polares (Fig. 57).

En este experimento la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1158 (A68) generó 20 unidades de índice de fluorescencia bajo condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$ , principalmente dentro del rango de los lípidos polares; por otro lado la cepa A204 también generó 21 unidades de índice de fluorescencia bajo condiciones de estrés mayoritariamente en el rango de lípidos polares (Fig. 58).

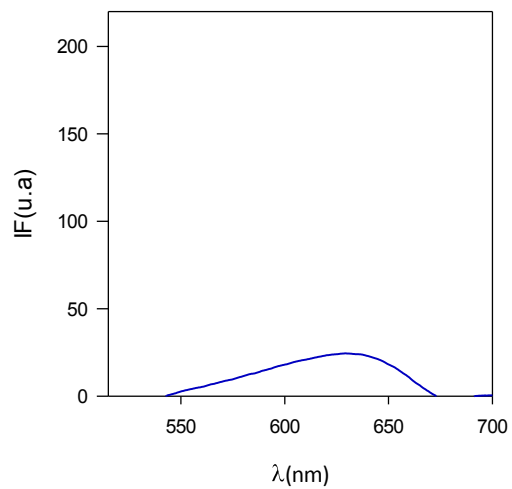
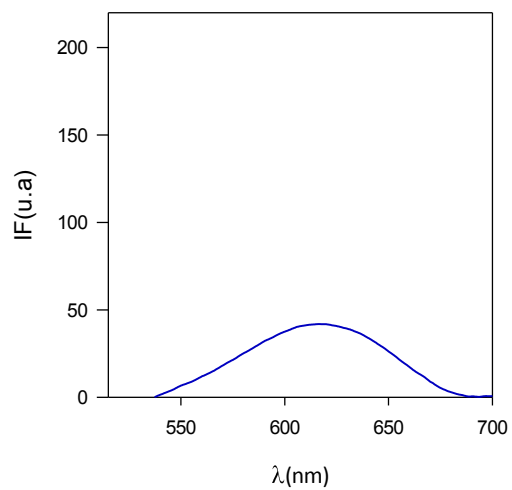
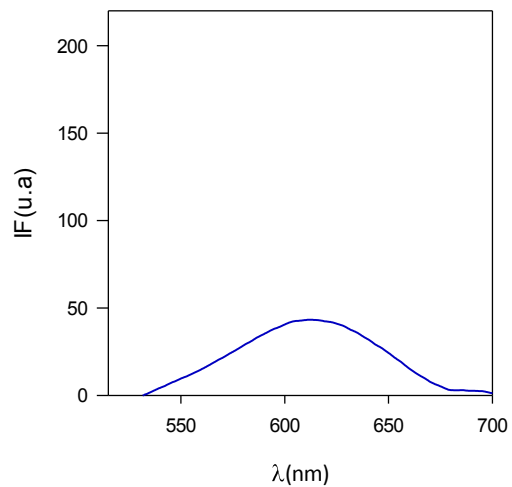


Fig. 57 Determinación de los lípidos neutros en las cepas seleccionadas A25, A40 y A46 en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$ )

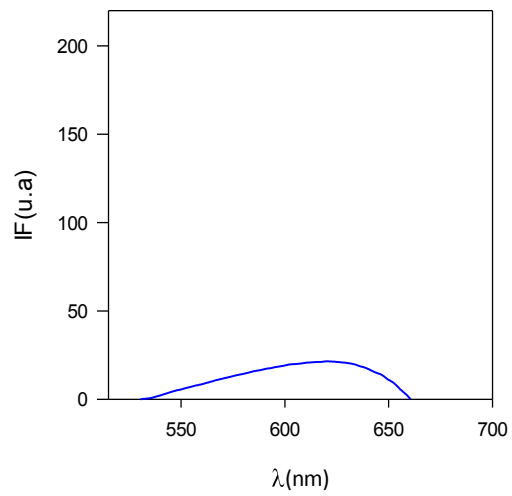
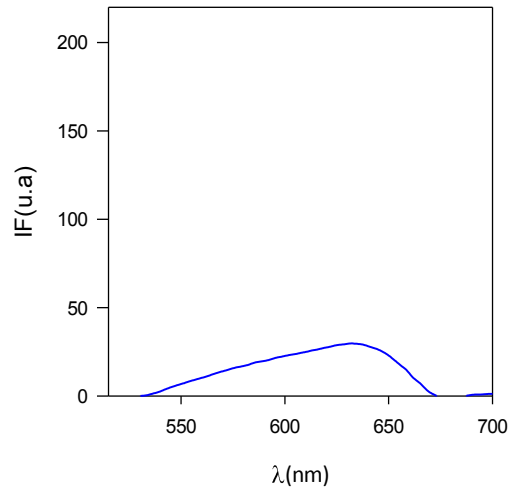


Fig. 58 Determinación de los lípidos neutros en la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1158 (A68) y la cepa seleccionada A204 en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$ )

En este experimento la cepa A9 bajo las mismas condiciones de intensidad lumínica  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol pero ahora a  $32^\circ\text{C}$  tuvo una disminución de un 60% en la cantidad de lípidos producidos, presentando 20 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 50 unidades producidas bajo estrés a  $25^\circ\text{C}$  sin embargo, la producción de los ácidos grasos permaneció dentro del rango de los lípidos neutros, asimismo, presentó un menor porcentaje de lípidos en un 28% principalmente en el rango de los lípidos polares en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 25 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares; en el caso de la cepa A12 la cantidad de lípidos disminuyó en un 36.% pasando de 19 unidades con las células creciendo bajo estrés a  $25^\circ\text{C}$  a 12 unidades de índice de fluorescencia bajo el mismo estrés pero a una temperatura de  $32^\circ\text{C}$  provocando una disminución en la cantidad de lípidos polares e incrementado la producción de lípidos neutros, asimismo, presentó un menor porcentaje de lípidos en un 52% principalmente en el rango de los lípidos neutros en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 25 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares; por otro lado la cepa A14 disminuyó la cantidad de lípidos en un 25% pasando de 20 unidades con las células creciendo bajo estrés a  $25^\circ\text{C}$  a 15 unidades de índice de fluorescencia bajo el mismo estrés pero a  $32^\circ\text{C}$ , sin embargo, se mantuvo dentro del rango de los lípidos polares, asimismo, presentó un menor porcentaje de lípidos en un 40% principalmente en el rango de los lípidos polares en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 25 unidades de índice de fluorescencia también en el rango de los lípidos polares (Fig. 59).

En este experimento la cepa A20 bajo las mismas condiciones de intensidad lumínica  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol pero ahora a  $32^\circ\text{C}$  tuvo un aumento de un 15.3% en la cantidad de lípidos producidos, presentando 30 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 26 unidades producidas bajo estrés a  $25^\circ\text{C}$ , generando además, el incremento en la cantidad de lípidos neutros y provocando una disminución de los lípidos polares, asimismo, presentó

un mayor porcentaje de lípidos en un 20% principalmente en el rango de los lípidos neutros en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 25 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares; en el caso de la cepa A29 la cantidad de lípidos disminuyó en un 52% pasando de 25 unidades con las células creciendo bajo estrés a 25°C a 12 unidades de índice de fluorescencia bajo el mismo estrés pero a una temperatura de 32°C incrementando a su vez, la cantidad de lípidos polares, asimismo, presentó un menor porcentaje de lípidos en un 52% principalmente en el rango de los lípidos polares en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 25 unidades de índice de fluorescencia igualmente en el rango de los lípidos polares; por otro lado la cepa A58 incrementó la cantidad de lípidos en un 6.5% pasando de 46 unidades con las células creciendo bajo estrés a 25°C a 49 unidades de índice de fluorescencia bajo el mismo estrés pero a 32°C; provocando un aumento en la cantidad de lípidos neutros y una disminución de los lípidos polares, asimismo, presentó un mayor porcentaje de lípidos en un 96% principalmente en el rango de los lípidos neutros en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 25 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares (Fig. 60).

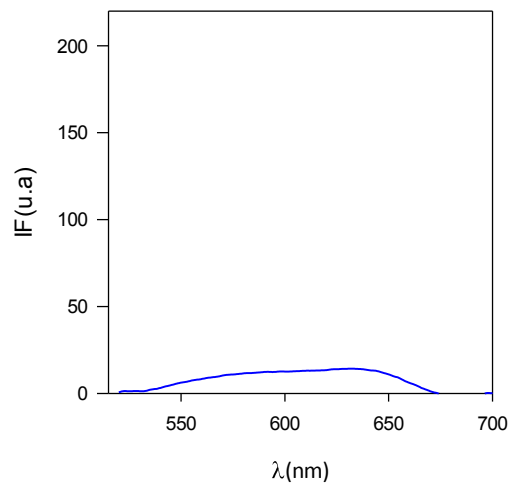
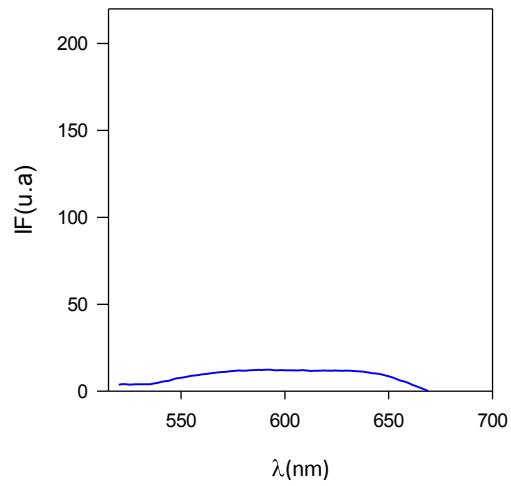
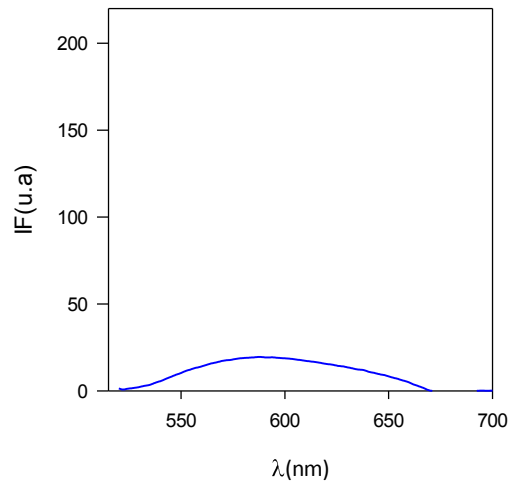


Fig. 59 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A9, A12 y A14 en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $32^\circ\text{C}$ )

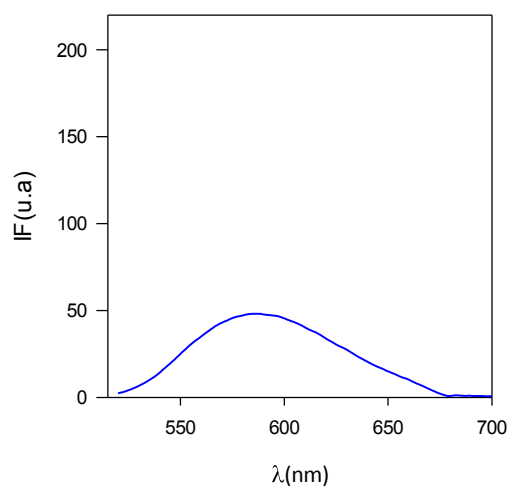
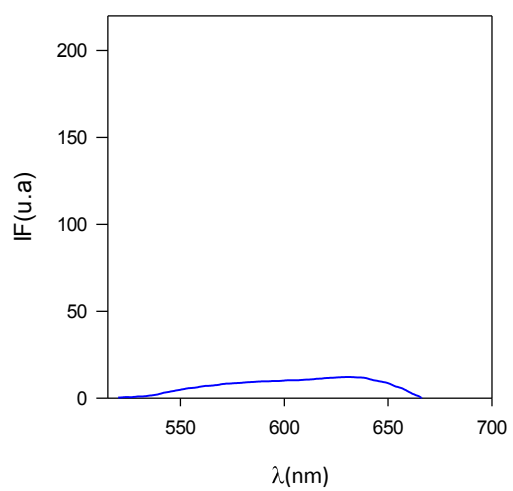
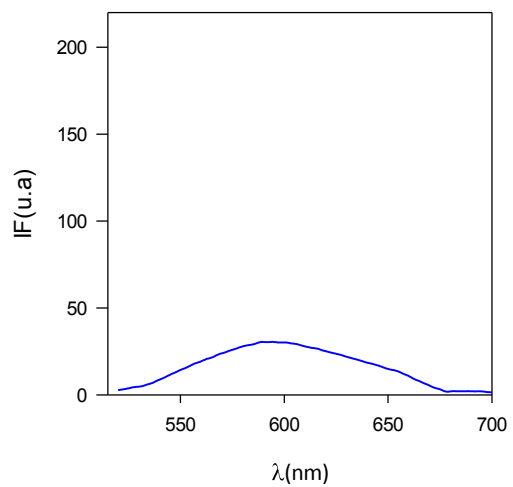


Fig. 60 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A20, A29 y A58 en condiciones de estrés (intensidad luminica  $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $32^\circ\text{C}$ )



En este experimento la cepa A61 bajo las mismas condiciones de intensidad lumínica  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol pero ahora a  $32^\circ\text{C}$  tuvo una disminución de un 21% en la cantidad de lípidos producidos, presentando 15 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 19 unidades producidas bajo estrés a  $25^\circ\text{C}$  sin embargo, la producción de los ácidos grasos se incrementó en el rango de los lípidos neutros y disminuyeron los lípidos polares, asimismo, presentó un menor porcentaje de lípidos en un 40% principalmente en el rango de los lípidos neutros en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 25 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares; en el caso de la cepa A38 la cantidad de lípidos disminuyó en un 65.3% pasando de 26 unidades con las células creciendo bajo estrés a  $25^\circ\text{C}$  a 9 unidades de índice de fluorescencia bajo el mismo estrés pero a una temperatura de  $32^\circ\text{C}$ ; provocando una disminución en la cantidad de lípidos polares e incrementado la producción de lípidos neutros, asimismo, presentó un menor porcentaje de lípidos en un 64% principalmente en el rango de los lípidos neutros en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 25 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares; por otro lado la cepa A40 disminuyó la cantidad de lípidos en un 30.9% pasando de 42 unidades con las células creciendo bajo estrés a  $25^\circ\text{C}$  a 29 unidades de índice de fluorescencia bajo el mismo estrés pero a  $32^\circ\text{C}$ ; incrementando los lípidos neutros y disminuyendo los lípidos polares, asimismo, presentó un mayor porcentaje de lípidos en un 16% principalmente en el rango de los lípidos neutros en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 25 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares (Fig. 61).

En este experimento la cepa A33 bajo las mismas condiciones de intensidad lumínica  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol pero ahora a  $32^\circ\text{C}$  tuvo una baja del 15% en la cantidad de lípidos producidos, presentando 17 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 20 unidades producidas bajo estrés a  $25^\circ\text{C}$  generando además, el incremento en la cantidad de lípidos

neutros y provocando una disminución de los lípidos polares, asimismo, presentó un menor porcentaje de lípidos en un 32% principalmente en el rango de los lípidos neutros en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 25 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares; en el caso de la cepa A47 la cantidad de lípidos disminuyó en un 59% pasando de 20 unidades con las células creciendo bajo estrés a 25°C a 12 unidades de índice de fluorescencia bajo el mismo estrés pero a una temperatura de 32°C; incrementando ligeramente, la cantidad de lípidos neutros, asimismo, presentó un menor porcentaje de lípidos en un 52% principalmente en el rango de los lípidos polares en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 25 unidades de índice de fluorescencia igualmente en el rango de los lípidos polares; por otro lado, la cepa A1 no solamente disminuyó la cantidad de lípidos en un 50% pasando de 36 unidades con las células creciendo bajo estrés a 25°C a 18 unidades de índice de fluorescencia bajo el mismo estrés pero a 32°C sino que provocó un aumento en la cantidad de lípidos polares y una disminución de los lípidos neutros, además, presentó un menor porcentaje de lípidos en un 28% principalmente en el rango de los lípidos polares en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 25 unidades de índice de fluorescencia también en el rango de los lípidos polares (Fig. 62).

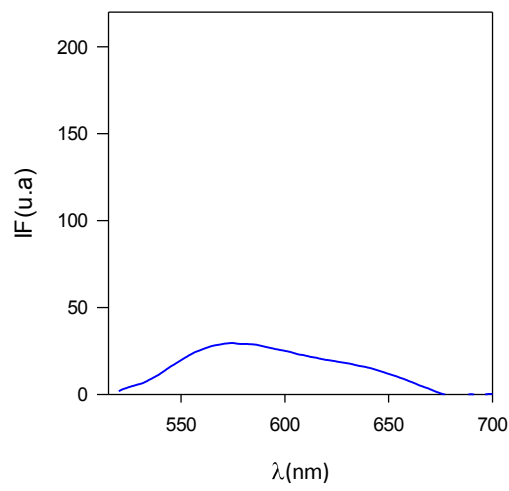
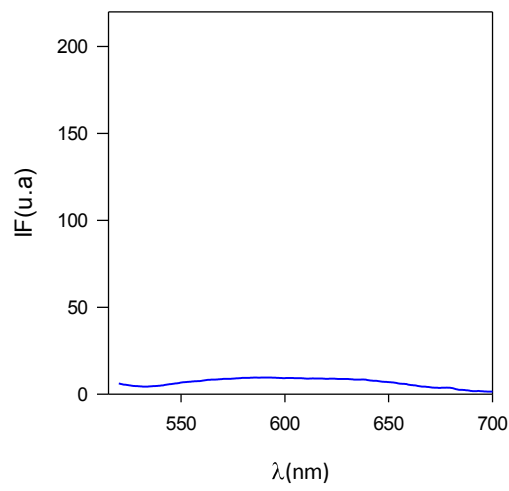
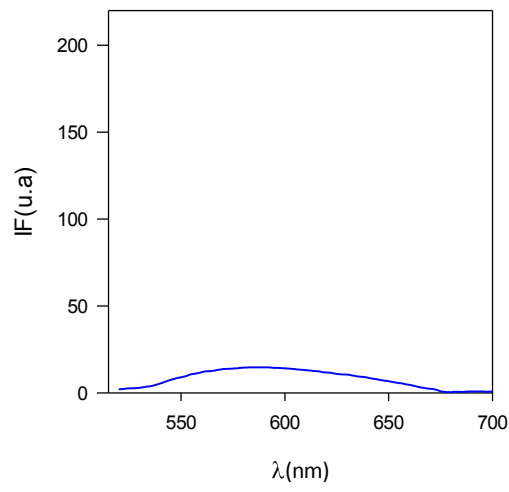


Fig. 61 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A61, A38 y A40 en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $32^\circ\text{C}$ )

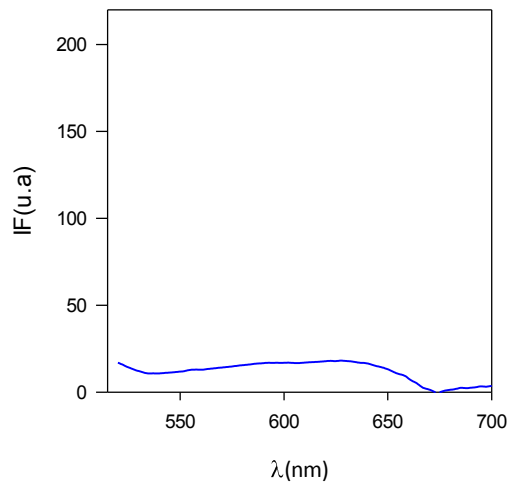
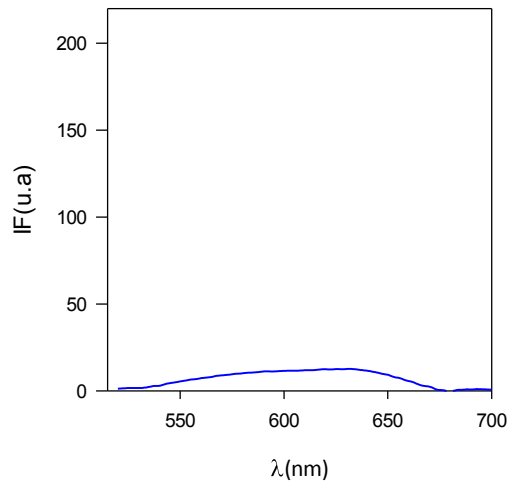
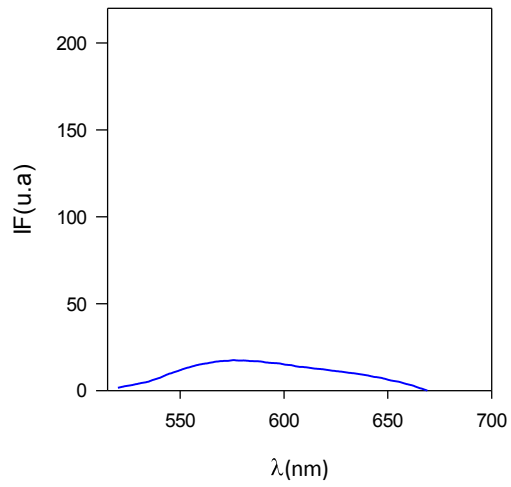


Fig. 62 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A33, A47 y A1 en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $32^\circ\text{C}$ )

En este experimento la cepa A54 bajo las mismas condiciones de intensidad lumínica  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol pero ahora a  $32^\circ\text{C}$  tuvo una disminución de un 70.9% en la cantidad de lípidos producidos, presentando 16 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 55 unidades producidas bajo estrés a  $25^\circ\text{C}$ , sin embargo, la producción de los ácidos grasos se mantuvo en el rango de los lípidos neutros, asimismo, presentó un menor porcentaje de lípidos en un 36% principalmente en el rango de los lípidos neutros en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 25 unidades de índice de fluorescencia principalmente en el rango de los lípidos polares; en el caso de la cepa A52 la cantidad de lípidos disminuyó en un 69.7% pasando de 76 unidades con las células creciendo bajo estrés a  $25^\circ\text{C}$  a 23 unidades de índice de fluorescencia bajo el mismo estrés pero a una temperatura de  $32^\circ\text{C}$ ; provocando una disminución en la cantidad de lípidos neutros e incrementado la producción de lípidos polares, asimismo, presentó un menor porcentaje de lípidos en un 8% principalmente en el rango de los lípidos polares en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés que generó 25 unidades de índice de fluorescencia también en el rango de los lípidos polares; por otro lado la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1158 (A68) aumentó la cantidad de lípidos en un 25% pasando de 20 unidades con las células creciendo bajo estrés a  $25^\circ\text{C}$  a 25 unidades de índice de fluorescencia bajo el mismo estrés pero a  $32^\circ\text{C}$ ; sin embargo, se incrementaron considerablemente los lípidos polares (Fig. 63).

En este experimento la cepa A204 bajo las mismas condiciones de intensidad lumínica  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol pero ahora a  $32^\circ\text{C}$  tuvo un incremento del 19% en la cantidad de lípidos producidos, presentando 25 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 21 unidades producidas bajo estrés a  $25^\circ\text{C}$ , además de que presentó la misma cantidad de unidades que la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo las mismas condiciones de estrés, sin embargo, al igual que la cepa de referencia generó un incremento en la cantidad de lípidos polares (fig. 64).

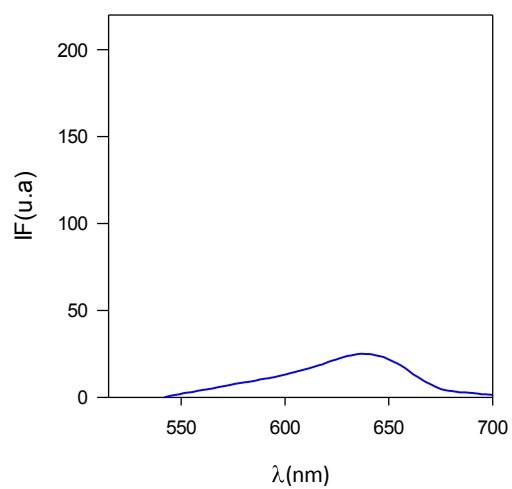
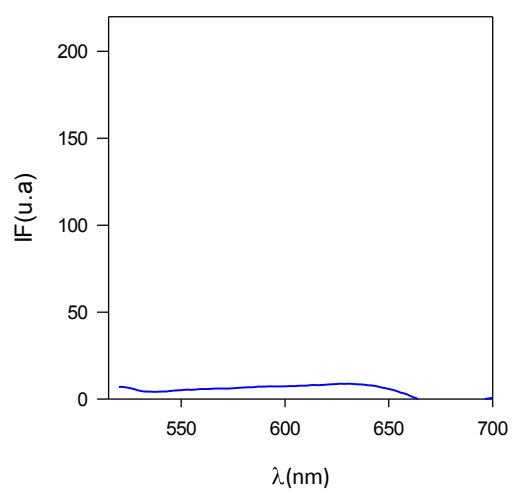
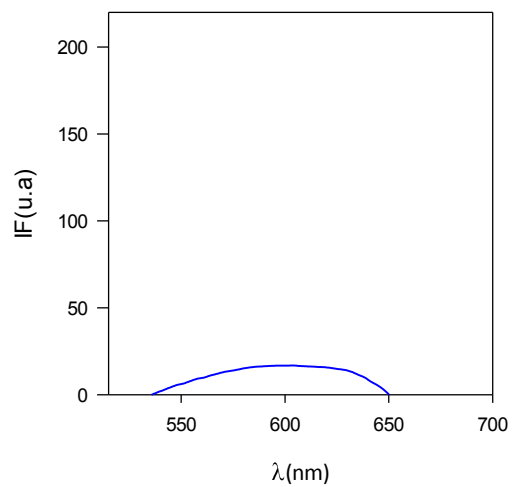


Fig. 63 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A54, A52 y *N. oleoabundans* UTEX 1158 (A68) en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $32^\circ$ )

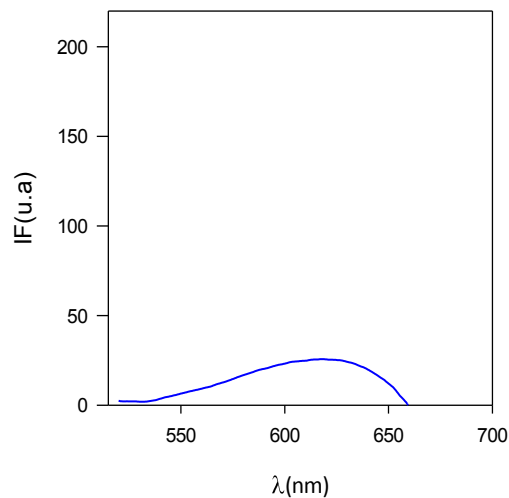


Fig. 64 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A204 en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $32^\circ\text{C}$ )

#### 4.3.1.2. Nivel de Luz de $90 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ a $25$ y $32^\circ\text{C}$

En este experimento la cepa A9 en condiciones de intensidad lumínica baja de  $90 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$  tuvo una cantidad de lípidos producidos igual al promedio de la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185, presentando 22 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 22.5 unidades principalmente dentro del rango de los lípidos polares producidas por la cepa de referencia, en condiciones de estrés de  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25$  y  $32^\circ\text{C}$ ; sin embargo, la producción de los ácidos grasos se incrementó en el rango de los lípidos polares y disminuyeron los lípidos neutros; en el caso de la cepa A43 la cantidad de lípidos fue mayor en un 344% en comparación al promedio presentado por la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 en condiciones de estrés de  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25$  y  $32^\circ\text{C}$ , generando 100 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), con área muy importante en el rango de los lípidos neutros; por otro lado la cepa A35 la cantidad de lípidos producida fue mayor en un 55.5% en comparación al promedio presentado por la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX

1185 en condiciones de estrés de  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a 25 y 32°C, generando 35 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), también con un área considerable en el rango de los lípidos neutros (Fig. 65).

En este experimento la cepa A46 en condiciones de intensidad lumínica baja de  $90 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a 25°C tuvo una cantidad de lípidos producidos mayor en un 33.3% en comparación al promedio de la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185, presentando 30 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 22.5 unidades principalmente dentro del rango de los lípidos polares producidas por la cepa de referencia, en condiciones de estrés de  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a 25 y 32°C; asimismo, la producción de los ácidos grasos se incrementó en el rango de los lípidos neutros y disminuyó la cantidad de lípidos polares; en el caso de la cepa A35 en condiciones de intensidad lumínica baja de  $90 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol pero a 32°C la cantidad de lípidos fue menor en un 11.1% en comparación al promedio presentado por la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 en condiciones de estrés de  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a 25 y 32°C; generando 20 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), principalmente en el rango de los lípidos neutros, además de que disminuyó también en un 42.8% la cantidad generada bajo las mismas condiciones pero a 25°C; asimismo, la cepa A43 en condiciones de intensidad lumínica baja de  $90 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol pero a 32°C; se vio claramente afectada por el incremento en la temperatura ya que la cantidad de lípidos producida fue menor en un 68.8% en comparación al promedio presentado por la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 en condiciones de estrés de  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a 25 y 32°C; generando solamente 7 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), y cayendo drásticamente la producción de lípidos neutros y por el contrario generando únicamente lípidos polares, asimismo, también bajó en un 93% en comparación a la cantidad generada por la misma cepa, bajo las mismas condiciones pero a 25°C (Fig. 66).



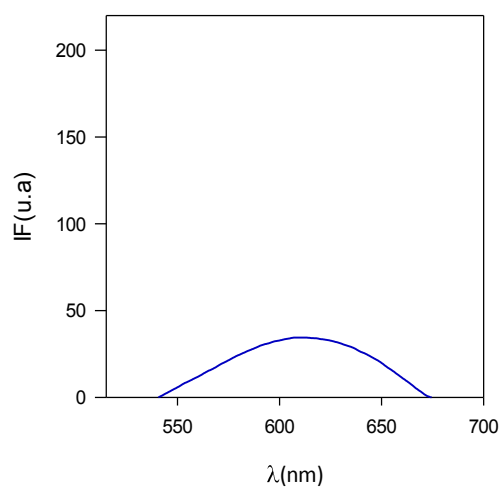
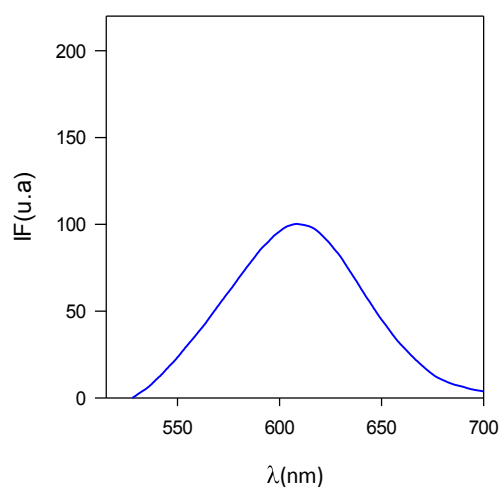
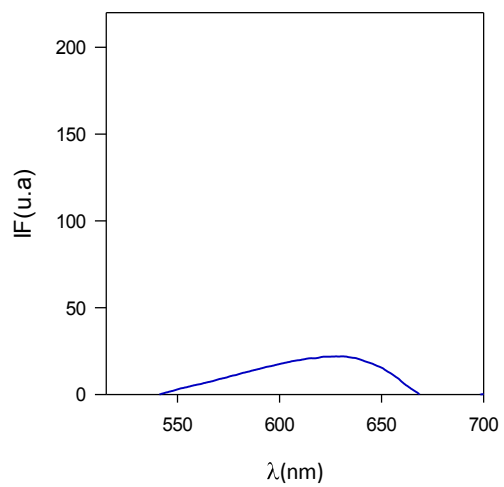


Fig. 65 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A9, A43 y A35 en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $90\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$ )

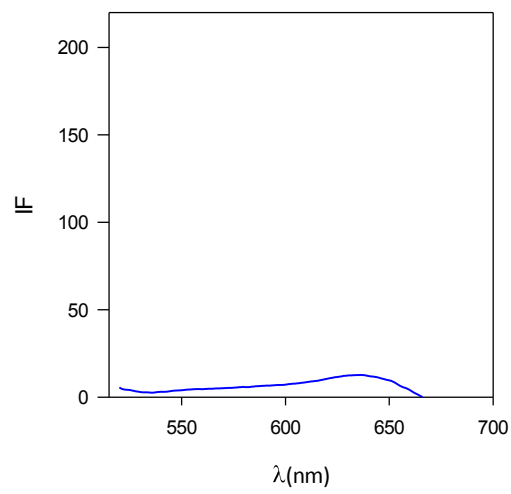
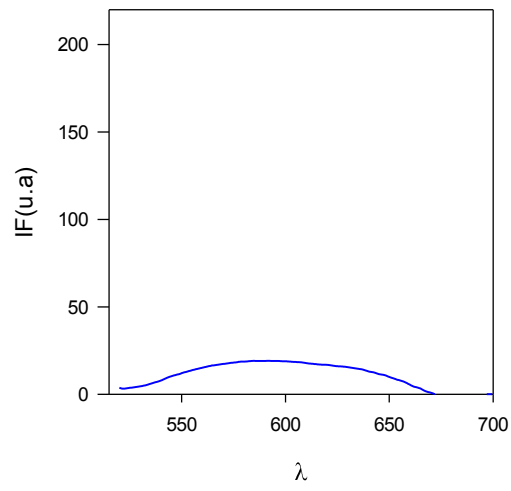
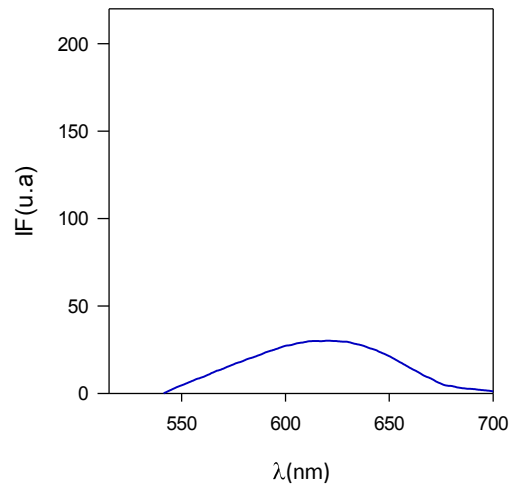


Fig. 66 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A46 en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $90\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ$ ) así como las cepas A 35 y A43 bajo la misma condición pero a  $32^\circ\text{C}$

#### 4.3.1.3. Nivel de luz de $490\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ a 25 y 32°C

En este experimento la cepa A9 en condiciones de intensidad lumínica alta de  $490\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a 25°C tuvo una cantidad de lípidos producidos igual al promedio de la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185, presentando 23 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 22.5 unidades principalmente dentro del rango de los lípidos polares producidas por la cepa de referencia, en condiciones de estrés de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a 25 y 32°C; sin embargo, la producción de los ácidos grasos se incrementó en el rango de los lípidos neutros y disminuyeron ligeramente los lípidos polares; en el caso de la cepa A35 la cantidad de lípidos fue mayor en un 113.3% en comparación al promedio presentado por la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 en condiciones de estrés de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a 25 y 32°C; generando 48 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), con área muy importante en el rango de los lípidos neutros; por otro lado, en la cepa A43 la cantidad de lípidos producida fue mayor en un 273.3% en comparación al promedio presentado por la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 en condiciones de estrés de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a 25 y 32°C; generando 84 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), también con un área muy importante en el rango de los lípidos neutros (Fig. 67).

En este experimento la cepa A46 en condiciones de intensidad lumínica alta de  $490\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a 32°C tuvo una cantidad de lípidos producidos menor en un 64.4% en comparación al promedio de la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185, presentando 8 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 22.5 unidades principalmente dentro del rango de los lípidos polares producidas por la cepa de referencia, en condiciones de estrés de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a 25 y 32°C, manteniéndose dentro del rango de los lípidos neutros; en el caso de la cepa A43 en condiciones de intensidad lumínica alta de  $490\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol pero a 32°C la cantidad de lípidos fue menor en un 77.7% en comparación al promedio presentado por la cepa de referencia *N. oleoabundans*

UTEX 1185 en condiciones de estrés de  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a 25 y 32°C, generando 5 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), principalmente en el rango de los lípidos polares, además de que disminuyó también en un 94% la cantidad generada bajo las mismas condiciones pero a 25°C (Fig. 68).

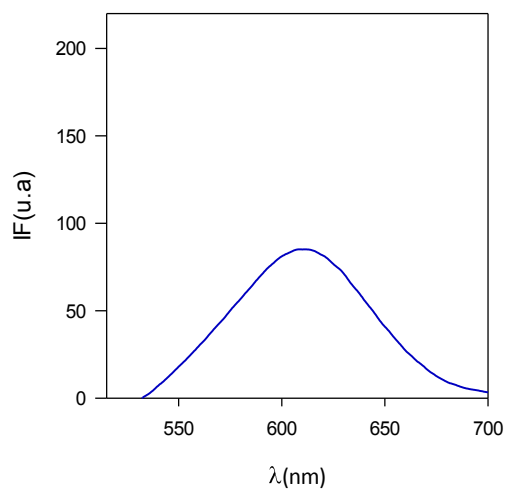
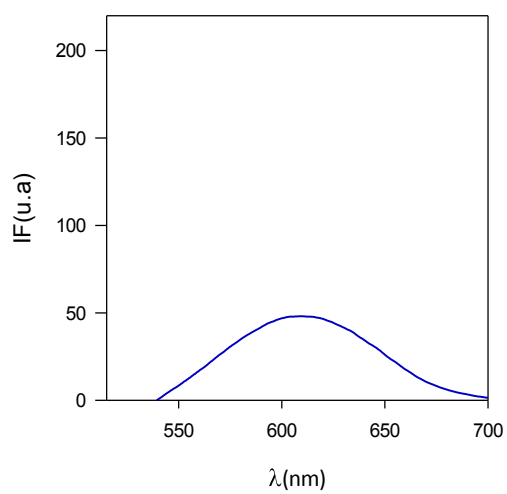
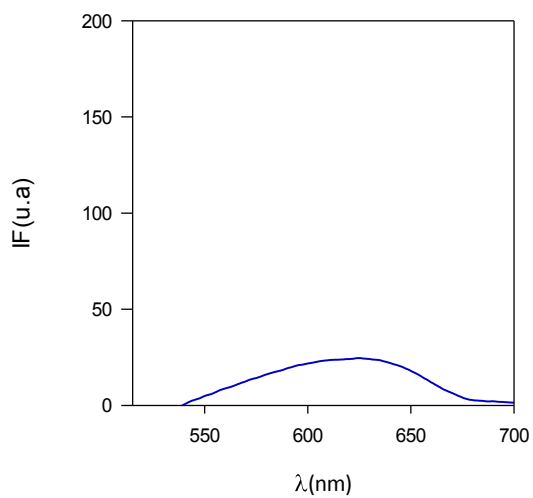


Fig. 67 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A9, A35 y A43 en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $490\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$ )

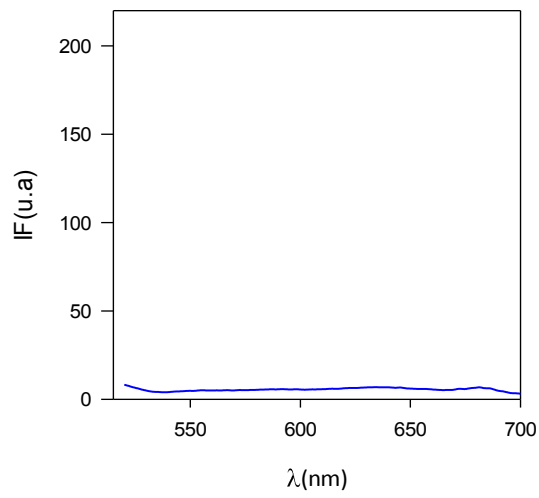
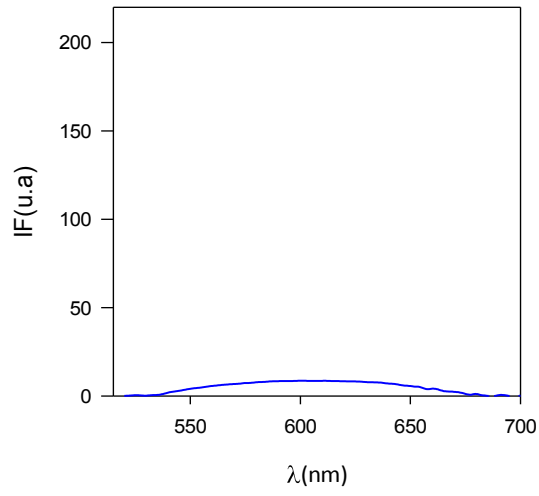


Fig. 68 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A46 y A43 en condiciones de estrés (intensidad luminica  $490\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $32^\circ\text{C}$ )

### 4.3.2. Efecto de fosfato y nitrato sobre el contenido de lípidos

#### 4.3.2.1. Efecto de fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (6.42mMol) y nitrato $\text{NaNO}_3$ (14.71mMol) a 25 y 32°C a una intensidad lumínica de $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ sobre el contenido de lípidos

En este experimento la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) en condiciones de intensidad lumínica normal de  $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol a 25°C tuvo una cantidad de lípidos producidos mayor en un 353.3% en comparación al promedio generado por ella misma en los experimentos anteriores que fueron a la misma intensidad de luz pero con cantidades menores de  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28mMol a 25 y 32°C, presentando 102 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 20 y 25 unidades respectivamente, además, la producción de los ácidos grasos se generó en el rango de los lípidos neutros, y disminuyeron drásticamente los lípidos polares; en el caso de la cepa A204 la cantidad de lípidos fue menor en un 70.5% en comparación a la cantidad presentada por la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 bajo las mismas condiciones de estrés de  $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol a 25°C; generando 30 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en el rango de los lípidos neutros, en comparación a las 102 unidades igualmente dentro del rango de los lípidos neutros producidas por la cepa de referencia, bajo las mismas condiciones de estrés de  $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol a 25°C; sin embargo, cuando la misma cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) se puso a las mismas condiciones (intensidad lumínica normal de  $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol) pero a 32°C mostró una cantidad de lípidos menor en un 30.3% en comparación al promedio presentado por la misma cepa a 25°C, generando 71 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), dentro del rango de los lípidos neutros en comparación a las 102 unidades igualmente dentro del rango de los lípidos neutros (Fig. 69).

En este experimento la cepa A18 en condiciones de intensidad lumínica normal de  $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol a 25°C tuvo una cantidad de lípidos producidos mayor en un 10.7% en comparación al promedio de la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185, presentando 113 unidades de índice de

fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 102 unidades principalmente dentro del rango de los lípidos neutros producidas por la cepa de referencia, bajo las mismas condiciones de estrés ( $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol a  $25^\circ\text{C}$ ), además, la producción de los ácidos grasos se incrementó en el rango de los lípidos neutros y disminuyeron los lípidos polares; en el caso de la cepa A4 la cantidad de lípidos fue mayor en un 73.5% en comparación al promedio presentado por la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 en las mismas condiciones de estrés ( $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol a  $25^\circ\text{C}$ ), generando 177 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en el rango de los lípidos neutros, en comparación a las 102 unidades igualmente dentro del rango de los lípidos neutros producidas por la cepa de referencia; sin embargo, las cepas A12, A14, A20 y A25, no se pudieron adaptar a estas condiciones de estrés y generaron escaso o nulo crecimiento en los cultivos; por otro lado, la cepa A33 generó una cantidad de lípidos mayor en un 65.6% en comparación al promedio presentado por la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 en condiciones de estrés de  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol a  $25^\circ\text{C}$ , generando 169 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), dentro del rango de los lípidos neutros en comparación a las 102 unidades también dentro del rango de los lípidos neutros producidas por la cepa de referencia, bajo las mismas condiciones de estrés (Fig. 70).



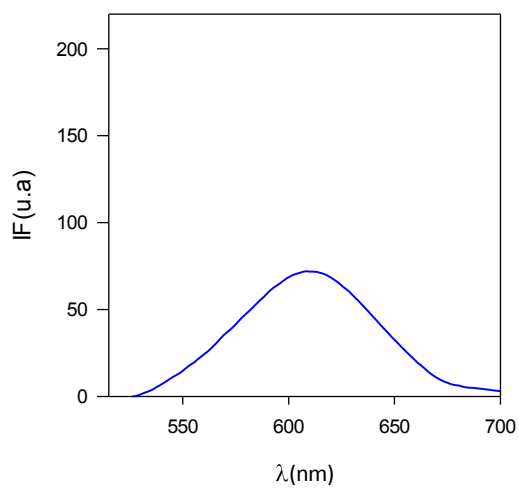
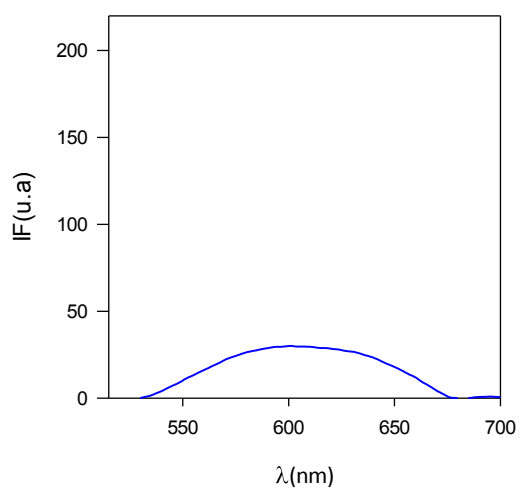
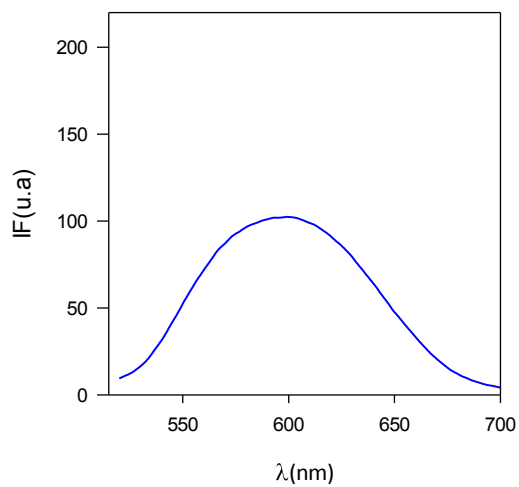


Fig. 69 Determinación de lípidos neutros en la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) y A204 a 25°C así como también en la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) a 32°C en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol).

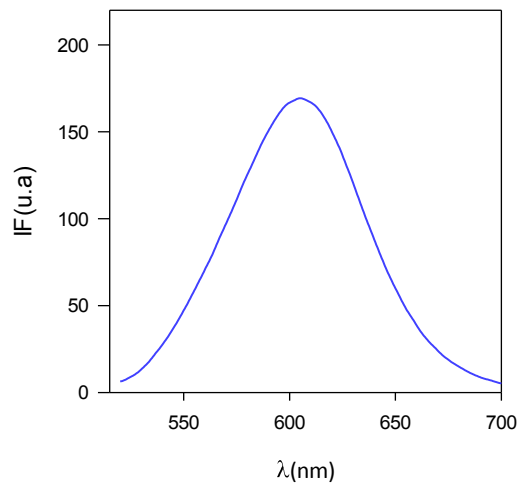
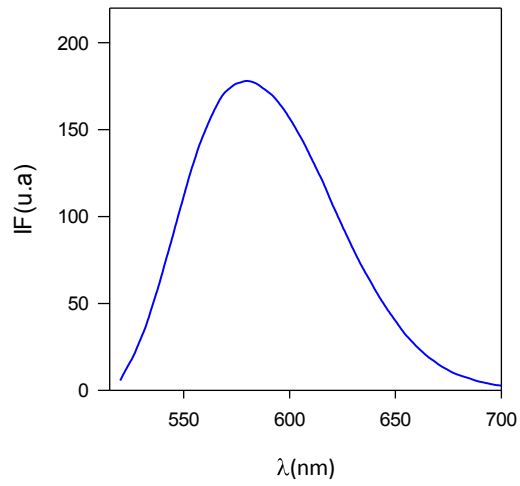
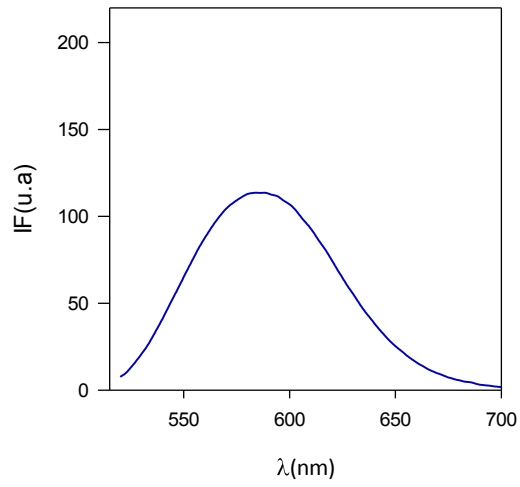


Fig. 70 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A18, A4 y A33 en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol a  $25^\circ\text{C}$ ).

#### **4.3.2.2. Efecto de fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (6.42mMol) y nitrato $\text{NaNO}_3$ (14.71mMol) a 25 y 32°C a una intensidad lumínica de $90\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ sobre el contenido lipídico**

En este experimento la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) en condiciones de intensidad lumínica baja de  $90\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol a 25°C, tuvo una cantidad de lípidos producidos de 102 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias) en el rango de los lípidos neutros, mientras que la cepa A35 no se pudo adaptar a estas condiciones de estrés y generó escaso o nulo crecimiento en los cultivos; por otro lado, cuando la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) fue puesta bajo las mismas condiciones (intensidad lumínica baja de  $90\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol) pero a 32°C tuvo una cantidad de lípidos producidos de 177 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), es decir, un 73.5% más en comparación a cuando fue crecida a 25°C; siendo producidos los ácidos grasos totalmente dentro del rango de los lípidos neutros (Fig. 71).

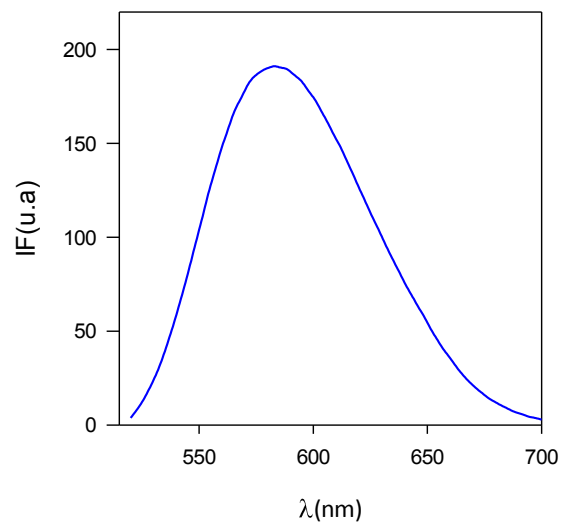
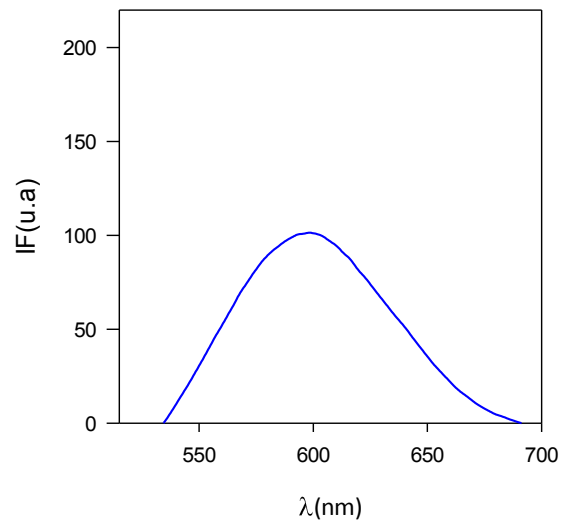


Fig. 71 Determinación de lípidos neutros en la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) a 25 y 32°C en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol).

#### **4.3.2.3. Efecto de fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (6.42mMol) y nitrato $\text{NaNO}_3$ (14.71mMol) a 25 y 32°C a una intensidad luminica de $490\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ sobre el contenido lipídico**

En este experimento la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) en condiciones de intensidad lumínica alta de  $490\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , y una cantidad alta de  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol a 25°C, tuvo una cantidad de lípidos producidos de 58 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias) en el rango de los lípidos neutros, mientras que a las mismas condiciones de estrés pero a 32°C presentó un incremento de un 268.9% generando 214 unidades de índice de fluorescencia, dentro totalmente en el rango de los lípidos neutros; por otro lado, la cepa A43 bajo las mismas condiciones de estrés a 25°C; generó una cantidad de lípidos mayor en un 1,527% en comparación al promedio presentado por la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 en condiciones de estrés de  $490\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol a 25°C; asimismo la cepa A43 presentó una cantidad de lípidos mayor en un 341% en comparación al promedio presentado por la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 bajo las mismas condiciones pero a 32°C, presentando una producción de 944 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), totalmente en el rango de los lípidos neutros (Fig. 72).

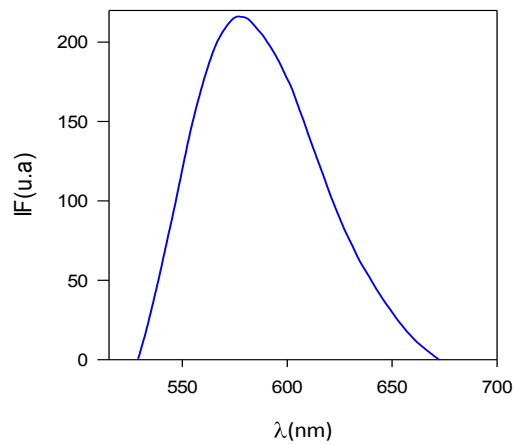
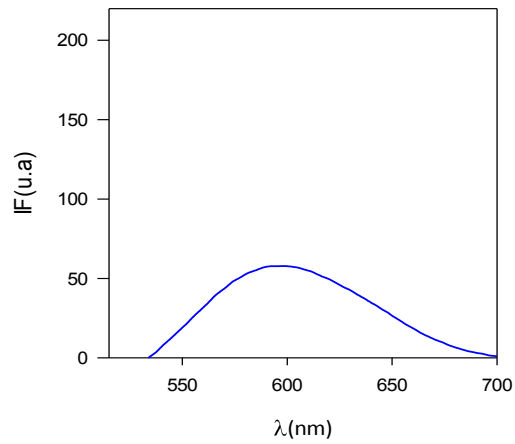
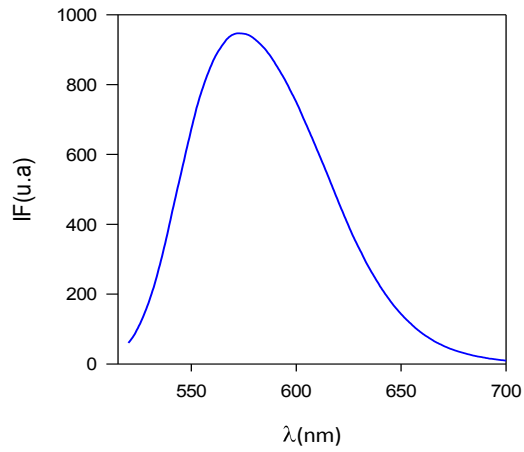


Fig. 72 Determinación de lípidos neutros en la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) a 25 y 32°C además de la cepa seleccionada A43 a 25°C en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $490 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$   $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol)

#### **4.3.2.4. Efecto de fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0.642mMol) y Nitrato $\text{NaNO}_3$ (1.47mMol) a 25 y 32°C a una intensidad lumínica de $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ sobre el contenido lipídico**

En este experimento la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) en condiciones de intensidad lumínica normal de  $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , pero una cantidad baja de  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol a 25°C tuvo una cantidad de lípidos producidos muy baja de 27 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), disminuyendo drásticamente los lípidos neutros y produciendo los ácidos grasos dentro del rango de los lípidos polares; en el caso de la cepa A204 la cantidad de lípidos fue menor en un 37% en comparación a la cantidad presentada por la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 bajo las mismas condiciones de estrés de  $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol a 25°C, generando 17 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en el rango de los lípidos polares, en comparación a las 27 unidades generadas por *N. oleoabundans* también dentro del rango de los lípidos polares, sin embargo, cuando esta misma cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) se puso a las mismas condiciones (intensidad lumínica normal de  $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol) pero a 32°C mostró una cantidad de lípidos mayor en un 59.2% en comparación al promedio presentado por la misma cepa a 25°C, generando 43 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), y disminuyendo drásticamente los lípidos polares y generando los ácidos grasos dentro del rango de los lípidos neutros, en comparación a las 27 unidades producidas dentro del rango de los lípidos polares (Fig. 73).

En este experimento la cepa A 14 en condiciones de intensidad lumínica normal de  $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , pero una cantidad baja de  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol a 25°C tuvo una cantidad de lípidos producidos menor en un 7.4% en comparación a la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68), presentando 25 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 27 unidades de *N. oleoabundans*, sin embargo, la producción de los ácidos grasos se generó en el rango de los lípidos neutros, y disminuyeron drásticamente los lípidos polares a diferencia de la cepa de referencia que presentó exactamente lo contrario produciendo los ácidos grasos dentro del rango de los lípidos polares; en el caso de la cepa A18 la cantidad de lípidos fue menor en un 18.5% en comparación a la cantidad presentada por la cepa de

referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 bajo las mismas condiciones de estrés de  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol a  $25^\circ\text{C}$ , generando 22 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en el rango de los lípidos neutros, en comparación a las 27 unidades generadas por *N. oleoabundans* dentro del rango de los lípidos polares, sin embargo, cuando la cepa A12 se puso bajo las mismas condiciones de estrés presentó escaso o nulo crecimiento en el medio de cultivo, mientras que la cepa A 4 bajo las mismas condiciones de estrés (intensidad lumínica normal de  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , pero una cantidad baja de  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol a  $25^\circ\text{C}$ ) tuvo una cantidad de lípidos producidos menor en un 44.4% en comparación a la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68), presentando 15 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 27 unidades de *N. oleoabundans*, sin embargo, la producción de los ácidos grasos continuó en el rango de los lípidos neutros, a diferencia de la cepa de referencia que presentó exactamente lo contrario produciendo los ácidos grasos dentro del rango de los lípidos polares (Fig. 74).



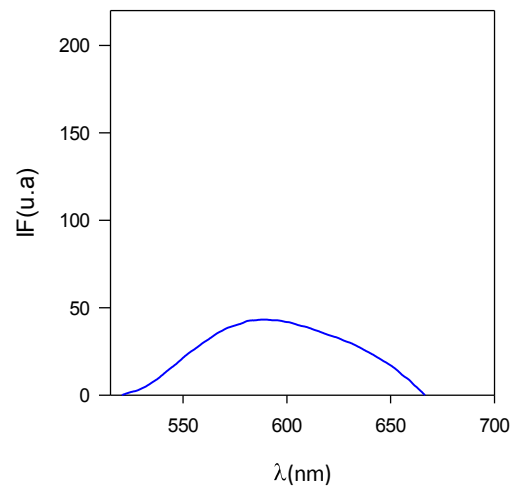
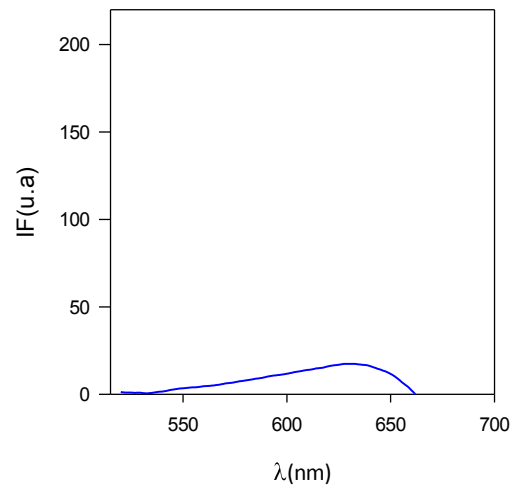
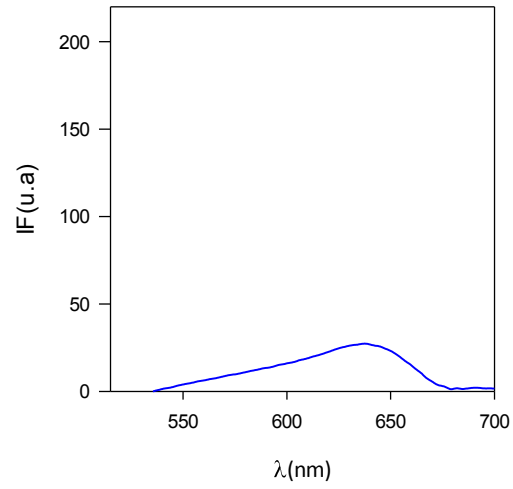


Fig. 73 Determinación de lípidos neutros en la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) a 25 y 32°C y la cepa seleccionada A204 a 25°C en condiciones de estrés (intensidad lumínica 445  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol).

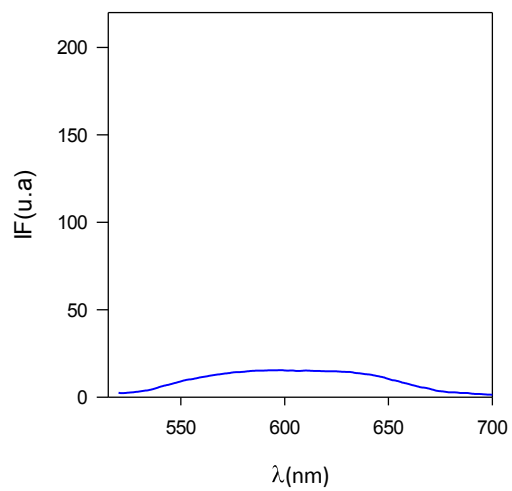
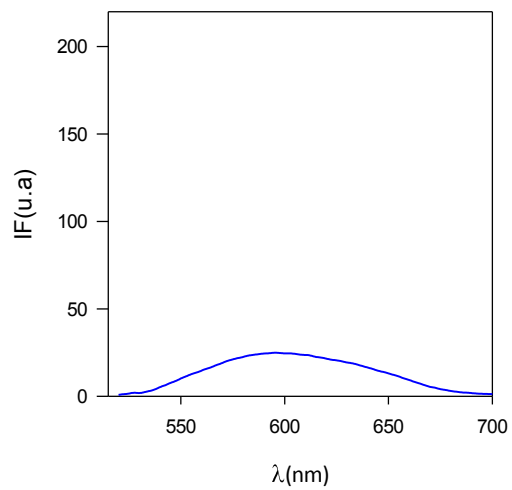
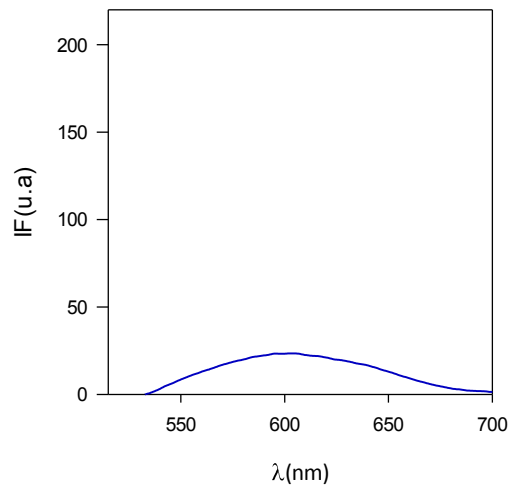


Fig. 74 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A14, A18 y A4 en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol a  $25^\circ\text{C}$ )

En este experimento la cepa A 33 en condiciones de intensidad lumínica normal de  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , pero una cantidad baja de  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol a  $25^\circ\text{C}$  tuvo una cantidad de lípidos producidos menor en un 55.5% en comparación a la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68), presentando 12 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 27 unidades de *N. oleoabundans*, presentando, la producción de los ácidos grasos en el rango de los lípidos polares, al igual que la cepa de referencia que también presentó los ácidos grasos dentro del rango de los lípidos polares; en el caso de la cepa A25 la cantidad de lípidos fue mayor en un 11.1% en comparación a la cantidad presentada por la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 bajo las mismas condiciones de estrés de  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol a  $25^\circ\text{C}$ , generando 30 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en el rango de los lípidos polares, en comparación a las 27 unidades generadas por *N. oleoabundans* también dentro del rango de los lípidos polares, mientras que la cepa A20 bajo las mismas condiciones de estrés (intensidad lumínica normal de  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , pero una cantidad baja de  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol a  $25^\circ\text{C}$ ) tuvo una cantidad de lípidos producidos también mayor en un 22.2% en comparación a la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68), presentando 33 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en comparación a las 27 unidades de *N. oleoabundans*, generando la producción de los ácidos grasos en el rango de los lípidos polares, al igual que la cepa de referencia que presentó los ácidos grasos dentro del rango de los lípidos polares (Fig. 75).

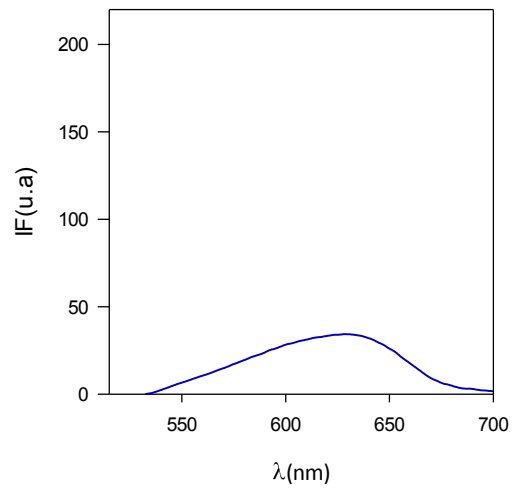
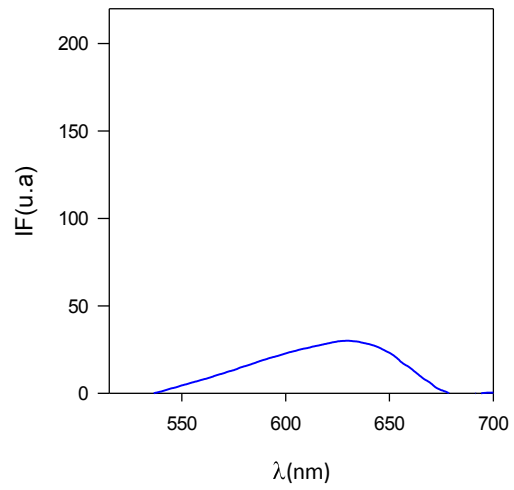
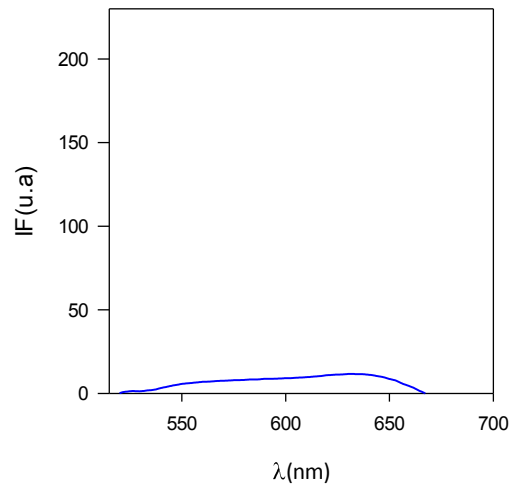


Fig. 75 Determinación de lípidos neutros en las cepas seleccionadas A33, A25 y A20 en condiciones de estrés (intensidad lumínica  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol a  $25^\circ\text{.C}$ )

#### **4.3.2.5. Efecto de fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0.642mMol) y nitrato $\text{NaNO}_3$ (1.47mMol) a 25 y 32°C a una intensidad lumínica de $90\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ sobre el contenido lipídico**

En este experimento la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) en condiciones de intensidad lumínica baja de  $90\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , y una cantidad baja de  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol a 25°C tuvo una cantidad de lípidos producidos muy baja de 26 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), disminuyendo drásticamente los lípidos neutros y produciendo los ácidos grasos dentro del rango de los lípidos polares; en el caso de la cepa A35 la cantidad de lípidos fue mayor en un 11.5% en comparación a la cantidad presentada por la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 bajo las mismas condiciones de estrés de  $90\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol a 25°C, generando 29 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en el rango de los lípidos polares, en comparación a las 26 unidades generadas por *N. oleoabundans* también dentro del rango de los lípidos polares, sin embargo, cuando esta misma cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) se puso a las mismas condiciones (intensidad lumínica baja de  $90\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol) pero a 32°C mostró una cantidad de lípidos mayor en un 265.3% en comparación al promedio presentado por la misma cepa a 25°C, generando 95 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), y disminuyendo drásticamente los lípidos polares y generando los ácidos grasos dentro del rango de los lípidos neutros, en comparación a las 26 unidades producidas dentro del rango de los lípidos polares a 25°C (Fig. 76).

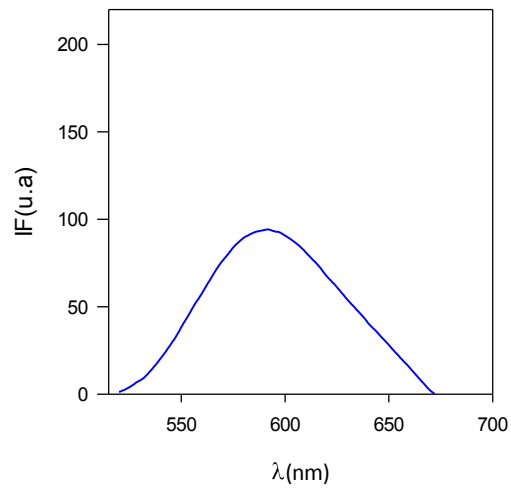
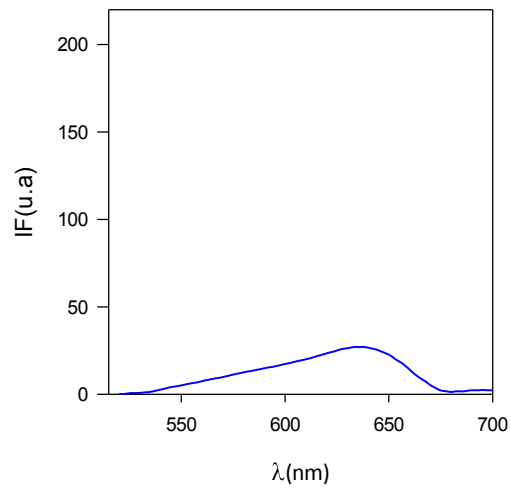
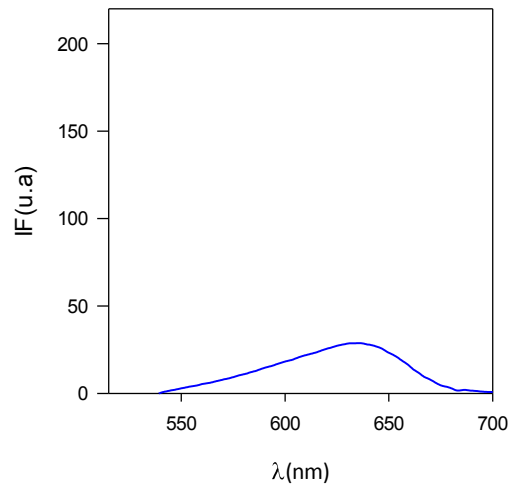


Fig. 76 Determinación de lípidos neutros en la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) a 25 y 32°C y la cepa seleccionada A35 a 25°C en condiciones de estrés (intensidad lumínica baja de  $90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , y una cantidad baja de  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol.

#### **4.3.2.6. Efecto de fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0.642mMol) y nitrato $\text{NaNO}_3$ (1.47mMol) a 25 y 32°C a una intensidad lumínica de $490\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ sobre el contenido lipídico**

En este experimento la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) en condiciones de intensidad lumínica alta de  $490\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , y una cantidad baja de  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol a 25°C tuvo una cantidad de lípidos producidos muy baja de 26 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), disminuyendo drásticamente los lípidos neutros y produciendo los ácidos grasos dentro del rango de los lípidos polares; en el caso de la cepa A43 la cantidad de lípidos fue menor en un 34.6% en comparación a la cantidad presentada por la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 bajo las mismas condiciones de estrés de  $490\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol a 25°C, generando 17 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en el rango de los lípidos neutros, en comparación a las 26 unidades generadas por *N. oleoabundans* dentro del rango de los lípidos polares, asimismo, cuando esta misma cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) se puso a las mismas condiciones (intensidad lumínica alta de  $490\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol) pero a 32°C mostró una cantidad de lípidos menor en un 23% en comparación al promedio presentado por la misma cepa a 25°C, generando 20 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), en el rango de los lípidos polares, en comparación a las 26 unidades producidas también dentro del rango de los lípidos polares a 25°C (Fig. 77).

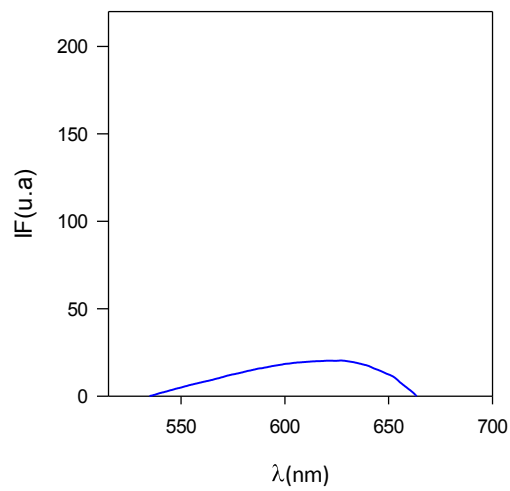
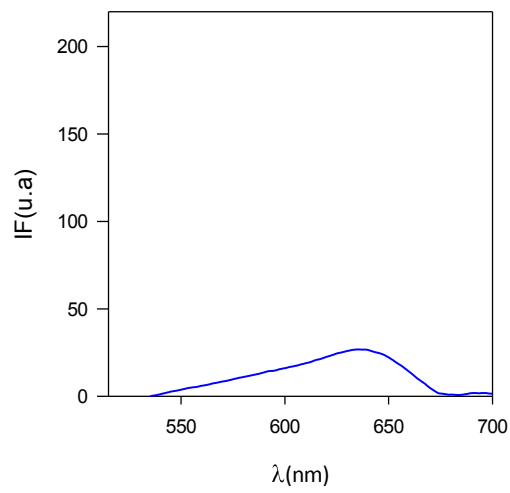
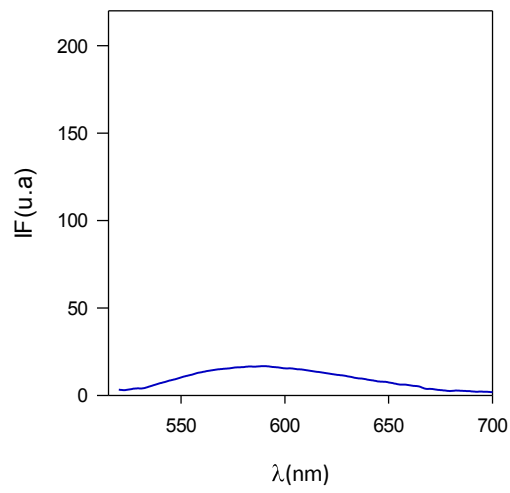


Fig. 77 Determinación de lípidos neutros en la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) a 25 y 32°C y la cepa seleccionada A43 a 25°C en condiciones de estrés (intensidad lumínica alta de  $490 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , y una cantidad baja de  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol).



#### **4.3.2.7. Comparativo de algunas cepas seleccionadas con *N. oleoabundans* bajo estrés.**

##### **° Efecto de 3 diferentes intensidades lumínicas 490, 445 and 90 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ sobre el contenido lipídico.**

Cuando se puso a la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) en condiciones de 3 intensidades lumínicas diferentes (alta de 490, media de 445 y baja de 90 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$  con una cantidad baja de  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol a 32°C) tuvo una producción de lípidos muy variable dependiendo de la intensidad, mostrando claramente la influencia de la luz sobre la cantidad y el tipo de lípido generado (neutro o polar); posteriormente se comparó a las cepas seleccionadas A9, A35, A43 y A46, con a la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 colocándolas también bajo las mismas tres intensidades de luz diferentes, lográndose observar que en todas influye también en la cantidad y el tipo de lípido, sin embargo solo la cepa A43 fue la que mostró un comportamiento semejante a la cepa de referencia (Fig. 78).

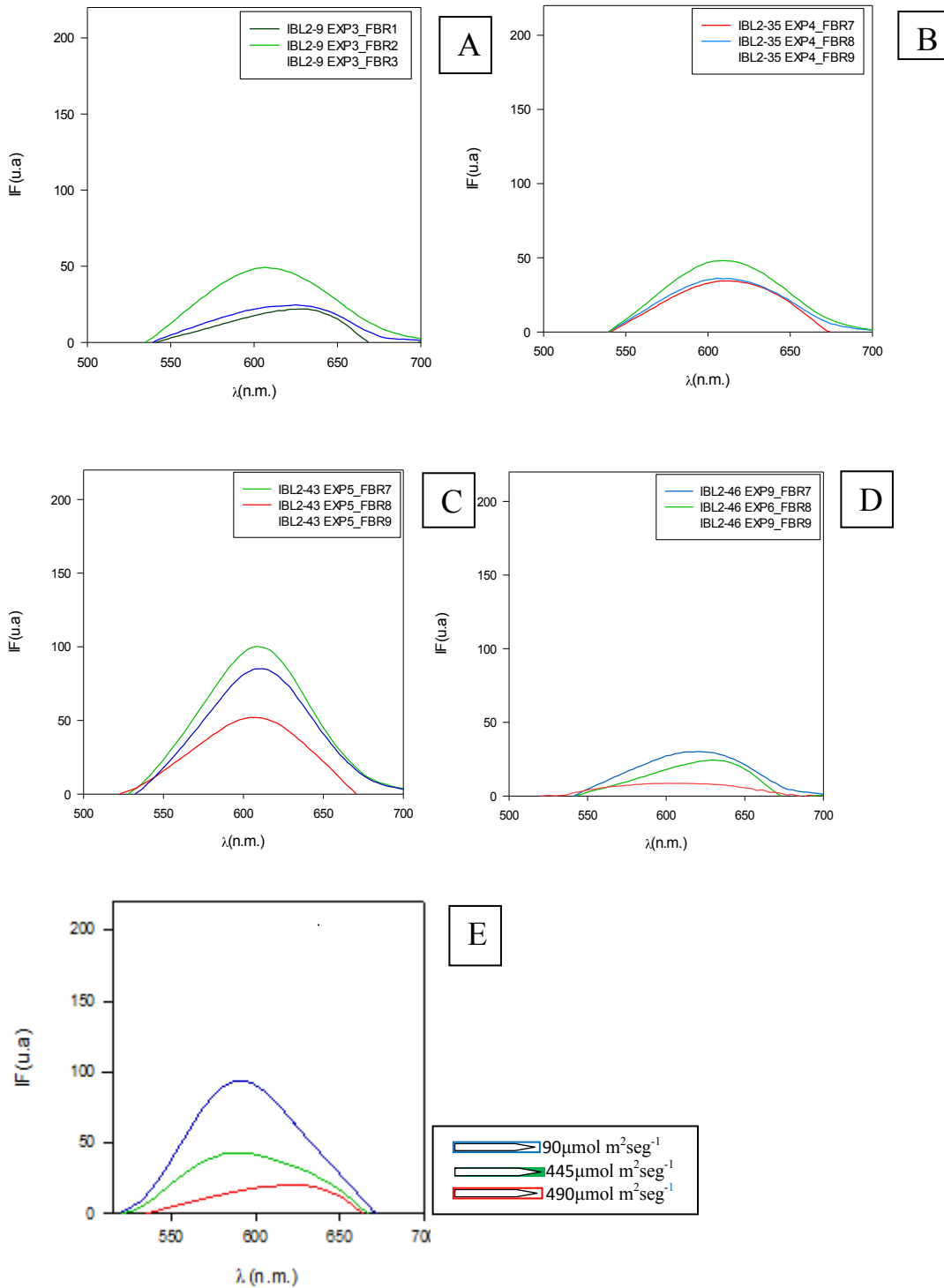


Fig. 78.- Cepas A9 (A), A35 (B), A43 (C) y A46 (D) en comparación con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (E) bajo condiciones de 3 intensidades lumínicas diferentes (alta de 490, media de 445 y baja de  $90\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ) para incrementar la generación de lípidos y guiar el metabolismo a la producción de lípidos neutros.

**° Efecto de diferentes condiciones de estrés sobre *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68)**

Las diferentes condiciones de estrés (intensidad lumínica, concentración de nitratos y fosfatos así como cambio de temperatura), llevadas a cabo sobre la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) arrojó como resultado la producción de diferentes cantidades de lípidos, así como también una clara influencia sobre el metabolismo de la microalga para llevarla a generar lípidos neutros en lugar de lípidos polares; siendo bajo las condiciones de luz baja a  $90\mu\text{mol m}^2\text{seg}^{-1}$  con una cantidad alta de  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol a  $32^\circ\text{C}$  que generó lípidos neutros y la segunda mayor cantidad de lípidos para esa cepa con 177 u.a.; sin embargo, cuando se hizo crecer bajo las condiciones de luz alta a  $490\mu\text{mol m}^2\text{seg}^{-1}$  con una cantidad también alta de  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol a  $32^\circ\text{C}$  generó la mas alta cantidad de lípidos neutros con 214 u.a., asimismo, cuando se colocó bajo las condiciones de luz baja a  $90\mu\text{mol m}^2\text{seg}^{-1}$  y una cantidad baja de  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol a  $32^\circ\text{C}$  generó lípidos neutros, en una cantidad de 95 u.a., por otro lado, cuando se puso bajo las condiciones de luz normal a  $445\mu\text{mol m}^2\text{seg}^{-1}$  con una cantidad alta de  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol a  $32^\circ\text{C}$  generó lípidos polares y una cantidad de lípidos de 71 u.a., también, cuando se colocó bajo las condiciones de luz normal a  $445\mu\text{mol m}^2\text{seg}^{-1}$  pero a una cantidad baja de  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol a  $32^\circ\text{C}$  generó lípidos neutros pero con una cantidad de lípidos de apenas 43 u.a., por ultimo, bajo las condiciones de luz alta a  $490\mu\text{mol m}^2\text{seg}^{-1}$  y una cantidad baja de  $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol a  $32^\circ\text{C}$  generó lípidos polares, con apenas una cantidad de 20 u.a., (Fig. 79).

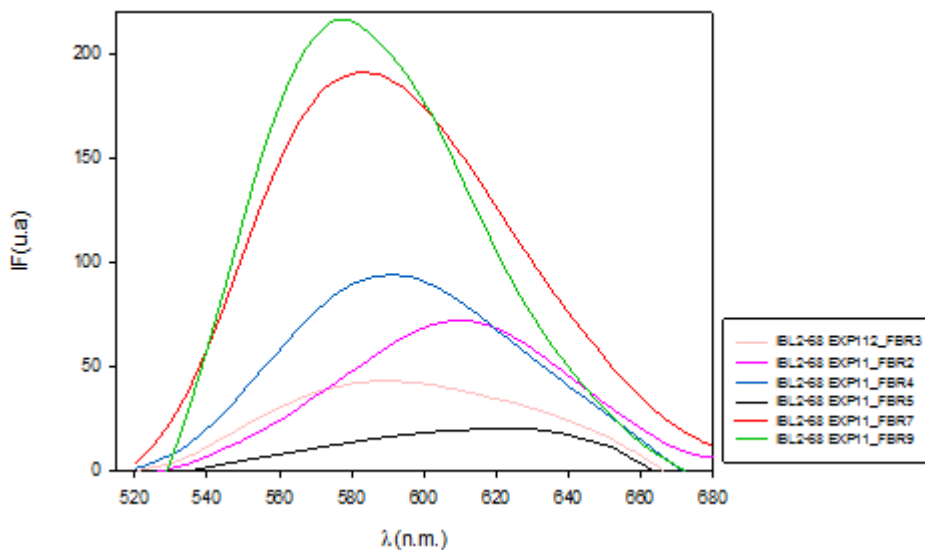
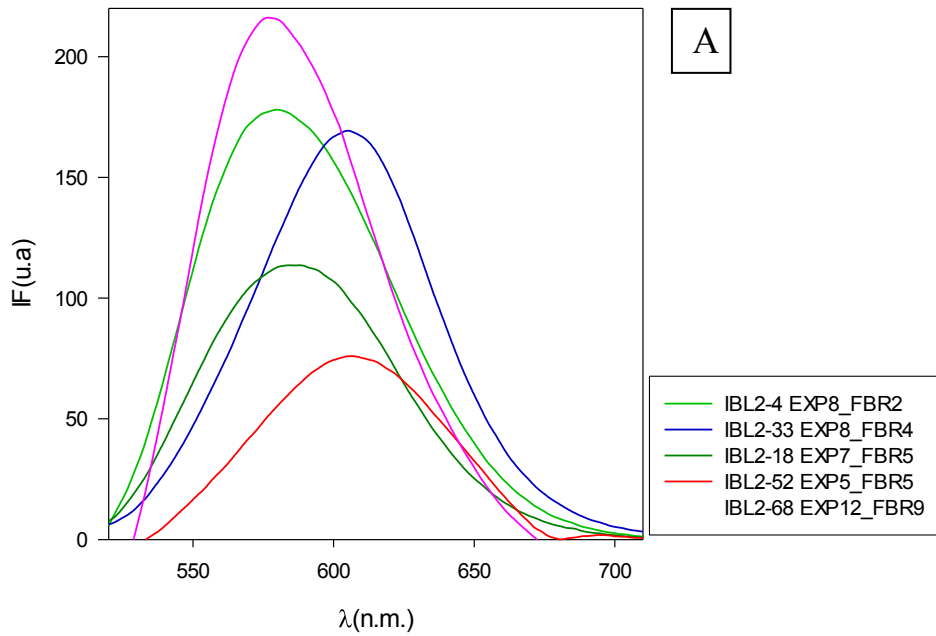


Fig. 79.- Efecto de 6 diferentes condiciones de estrés sobre *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68). Las diferentes condiciones de estrés (intensidad lumínica, concentración de nitratos y fosfatos así como cambio de temperatura), llevadas a cabo sobre la cepa de referencia, arrojó como resultado la producción de diferentes cantidades de lípidos, así como también, una clara influencia sobre el metabolismo de la microalga para generar lípidos neutros en lugar de lípidos polares.

° **Cepas aisladas seleccionadas con mayor producción de lípidos comparadas con la cepa de referencia *N. oleoabundans***

Las diferentes condiciones de estrés (intensidad lumínica, concentración de nitratos y fosfatos así como cambio de temperatura), aplicadas sobre las cepas aisladas seleccionadas, arrojó como resultado la detección de las cepas con la mas alta producción de lípidos neutros, utilizando como referencia a la cepa *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) con 214 u.a., tenemos que la cepas A4 y A33 bajo las condiciones de luz normal a  $445\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$  con una cantidad alta de  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{deKH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol a  $25^\circ\text{C}$  generaron lípidos neutros, teniendo una producción muy parecida con la cepa de referencia con 177 y 169 u.a. respectivamente, seguidas por la cepas A18 y A52 con 115 y 80 unidades de índice de fluorescencia (u.a.) respectivamente (Fig. 80 A)., por otro lado, la cepa A43 bajo las condiciones de luz alta a  $490\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$  con una cantidad alta de  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{deKH}_2\text{PO}_4$  6.42mMol a  $25^\circ\text{C}$  generó lípidos neutros, presentando una producción 341% mas alta con 944 u.a., que el máximo producido por la cepa de referencia *N. oleoabundans* el cual

fué de 214u.a., por lo tanto, esta cepa bajo estas condiciones específicas de estrés, puede ser considerada como posible candidata en la producción de lípidos para la generación de biocombustibles (Fig. 80 B).



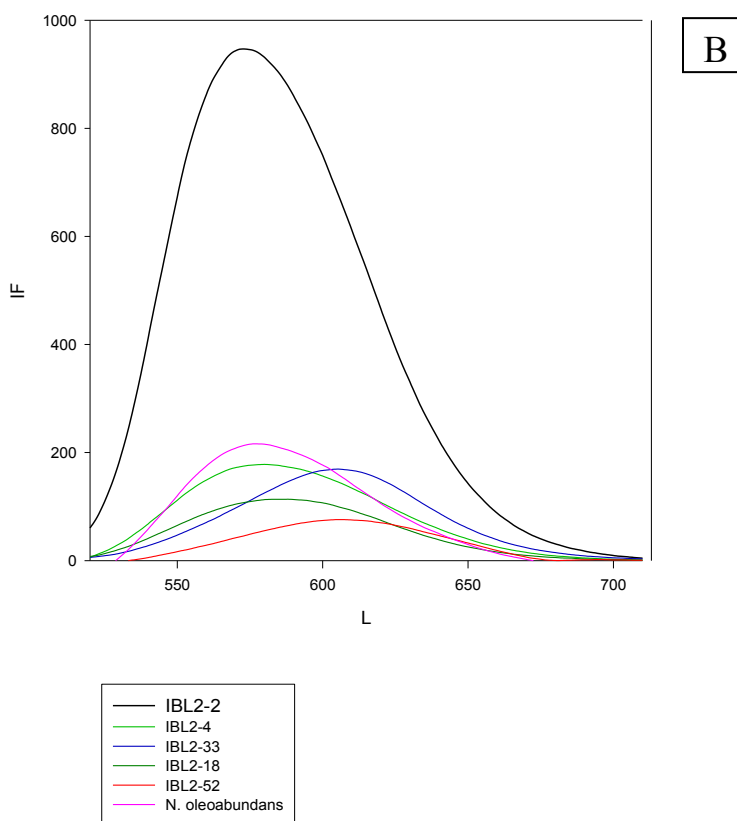


Fig. 80.- Efecto de diferentes condiciones de estrés sobre las cepas aisladas seleccionadas, con mayor producción de lípidos A4, A18, A33 y A52 comparadas con la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) con 214 u.a. (A). Mientras que la cepa A43 bajo las condiciones de luz alta a  $490\mu\text{mol m}^2\text{seg}^{-1}$  con una cantidad alta de  $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{deKH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol a  $25^\circ\text{C}$  generó una mayor cantidad de lípidos neutros, presentando una producción 341% mas alta, que el máximo producido por la cepa de referencia *N. oleoabundans* con 944 u.a. (B).

#### ° Diferentes condiciones de estrés sobre la cepa no generadora de biofilm A12

Por otro lado, La cepa A12 al ser puesta bajo las diferentes condiciones de estrés (intensidad lumínica, concentración de nitratos y fosfatos así como cambio de temperatura), nunca generó biofilm, siendo una característica muy importante en ésta cepa, debido a que se puede utilizar en fotobiorreactores muy elaborados o que cumplen doble función como producir biomasa y al mismo tiempo funcionar como aislante de edificios para disminuir la temperatura e incluso en fotobiorreactores tubulares

formando largas estructuras en forma de serpentín, que al cosechar la biomasa se colectaría el 100% y disminuiría enormemente el gasto por el costo de limpieza debido a su nula adherencia a las paredes de los fotobiorreactores; sin embargo, a pesar de que la cantidad de biomasa fue muy buena llegando a tener hasta  $2.8 \times 10^7$  cel/ml en condiciones de luz normal a  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$  con una cantidad normal de  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$  y  $1.9 \times 10^7$  cel/ml y bajo las mismas condiciones pero a  $32^\circ\text{C}$ ., a pesar de eso, la cantidad de lípidos fue muy baja con apenas 19 y 12 unidades de fluorescencia (u.a.), asimismo, cuando se intento crecer la cepa en condiciones mas altas y mas baja de nitratos y fosfatos la microalga presentó un minimo crecimiento., por lo tanto, para la microalga A12 se debe continuar su investigación para lograr incrementar su síntesis de lípidos, y en base a su característica de no adherencia, se podrían utilizar fotobiorreactores mas dinámicos en su elaboración; necesarios para producción de diferentes productos de alto valor agregado como proteínas o antioxidantes entre otros (Fig. 81).

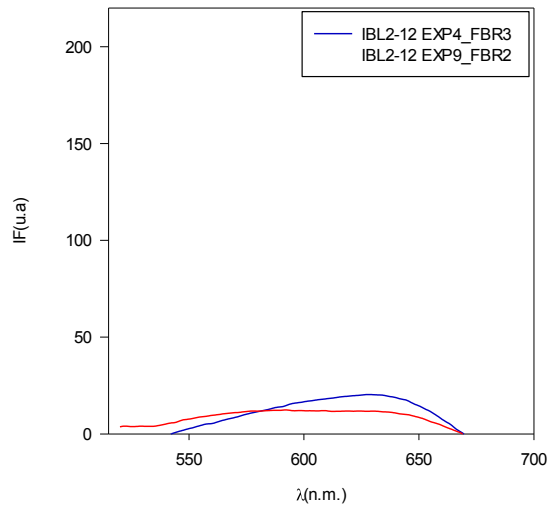


Fig. 81.- Efecto de 2 condiciones de estrés sobre la cepa A12 en la producción de lípidos. Luz normal a  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$  y cantidad normal de  $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol a  $25^\circ\text{C}$ , generó lípidos polares y en baja cantidad (línea azul) y a  $32^\circ\text{C}$  incrementó la cantidad de lípidos neutros pero en escasa cantidad (línea roja).

Al comparar las cepas A40, A33, A61 y A12 de 25°C y que presentaban lípidos polares, cuando fueron puestas a 32°C desviaron sus síntesis de ácidos grasos a lípidos neutros aunque en algunos casos en menor cantidad; Sin embargo, cuando se llevo a cabo a la inversa, es decir, de las cepas que a 32°C presentaban lípidos polares y luego se pasaron a ser crecidas a 25 °C y que produjeron lípidos neutros, solo fue la cepa A1



## 4.4. DISCUSION

### 4.4.1. Determinación de condiciones de estrés

Los principales indicadores que determinan el potencial de una microalga para producción de biodiesel son el crecimiento, el contenido de lípidos, el perfil y la productividad de los mismos (Gong y Jiang 2011). Este último parámetro determina el costo del proceso de cultivo, Por lo tanto, un proceso ideal debería permitir la producción de lípidos a la más alta productividad celular, con el contenido más alto posible en las células (Li et al. 2008). En general, en condiciones óptimas de crecimiento las algas producen predominantemente lípidos polares (Chisti 2007). Sin embargo cuando las microalgas se someten a condiciones de estrés impuestas por estímulos ambientales químicos y físicos, solos o en combinación, ocurre síntesis y acumulación de grandes cantidades de triglicéridos, acompañada por considerables alteraciones en la composición de los lípidos y ácidos grasos.

El colorante Rojo Nilo es una prometedora tinción fluorescente para una rápida cuantificación de lípidos celulares. Se utilizó en las cepas de microalgas seleccionadas y demostró ser eficaz en varias cepas de microalgas. Debido al objetivo que se perseguiría en este trabajo buscando determinar las condiciones optimas de estrés, para una mayor producción de lípidos neutros, ésta se realizó determinando la cantidad de lípidos neutros mediante la sonda fluorescente Rojo Nilo.

Las cepas sin estrés presentaron muy pocos lípidos neutros y el resto presentaba lípidos polares, mismos que eran producidos en pequeñas cantidades, por lo tanto se debían establecer métodos para redirigirlos flujos metabólicos a la acumulación de lípidos, estableciendo condiciones de estrés fisiológico como privación de nutrientes, cambio de temperatura, aumento de la salinidad (Chisti 2013), e intensidad de iluminación (Cornet y Dussap 2009; Chen et al. 2011; Takache et al. 2012).

#### **4.4.2. Evaluación de lípidos neutros en cepas con medio bristol a diferente intensidad lumínica ( $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ) a $25^{\circ}\text{C}$**

La tasa específica de crecimiento de las microalgas depende de la intensidad de la luz. El crecimiento de las microalgas se incrementa conforme la intensidad de luz aumenta. Cuando la tasa de crecimiento llega a su punto máximo, ésta disminuye con el incremento de la intensidad de la luz debido a la fotoinhibición (Bohne y Linden 2002). Este patrón de crecimiento en relación con la intensidad de la luz se observa en la mayoría las especies de microalgas (Fábregas et al. 1998). Se ha reportado que la producción y acumulación de metabolitos de interés comercial se ve afectada por la radiación de luz blanca en algas, hongos y bacterias (Martin 2010). Sin embargo, la intensidad y el régimen de la iluminación varían con el género de microalga.

Por lo anterior, se consideró el parámetro de la intensidad lumínica, incrementando ésta de 32 a  $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  observandose que de las 6 cepas que en un principio producían lípidos neutros 5 los dejaron de producir (A3, A33, A40, A58 y A61) y en cambio generaron lípidos polares, además de que 3 también disminuyeron la cantidad producida de lípidos, la cepa de referencia también mostró un cambio de lípidos neutros a lípidos polares manteniendo la misma cantidad (20 unidades), en cambio la cepa A43 fue la única que siguió presentando lípidos neutros pero en menor cantidad pasando de 76 a 51 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias), sin embargo otras 5 cepas (A1, A9, A35, A52 y A54) disminuyeron su cantidad de lípidos polares e incrementaron los lípidos neutros, siendo 4 cepas las mas sobresalientes en cuanto a la cantidad mostrada de lípidos neutros la A9, A43, A52 y A54 con 50, 51, 76 y 55 unidades de índice de fluorescencia respectivamente, cabe mencionar que estas 4 cepas, bajo este parámetro en particular, generaron lípidos neutros y en una mayor cantidad que la cepa de referencia *N. oleoabundans* que generó 20 unidades dentro del rango de los polares.

#### **4.4.3. Evaluación de lípidos neutros en cepas con medio bristol a diferente temperatura ( $32^{\circ}\text{C}$ ) a una intensidad lumínica de $445 \mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$**

La acumulación de componentes de ácidos grasos puede ser controlada por condiciones ambientales tales como temperatura, disponibilidad de nutrientes y salinidad. La temperatura

de crecimiento es un factor importante que influye drásticamente en la acumulación de lípidos en general o en la composición lipídica en particular. Por ejemplo, una temperatura de crecimiento más alta puede estimular la acumulación de lípidos en microalgas o una temperatura de crecimiento más baja puede conducir a un incremento de ácidos grasos saturados (Van Thang et al. 2015) ; por lo tanto, a pesar de que se había incrementado la intensidad lumínica ahora se modificó otro parámetro, siendo este el de la temperatura, incrementándola de 25 a 32°C generando 9 cepas con lípidos neutros de las cuales la cepa A9 y A54 continuaron generando lípidos neutros pero en menor cantidad, pasando de 50 a 20 unidades en el caso de la cepa A9 y de 55 a 16 unidades en el caso de la cepa A54, por otro lado, las otras 7 cepas que bajo este cambio de temperatura ahora produjeron lípidos neutros son las cepas A12, A20, A33, A38, A40, A58 y A61, siendo solo 3 cepas, la A20, A40 y la A58 las que generaron una mayor cantidad de lípidos neutros con 30, 29 y 49 unidades respectivamente, en comparación a la cepa de referencia *N. oleoabundans* que generó 25 unidades de índice de fluorescencia pero dentro del rango de los lípidos polares, asimismo, hubo 2 cepas que a 25°C generaban lípidos neutros pero a 32°C su metabolismo generó lípidos polares y en menor cantidad, siendo estas las cepas A1 y A52 bajando de 36 a 18 y de 76 a 23 unidades respectivamente.

#### **4.4.4. Evaluación de lípidos neutros en cepas con medio bristol a una intensidad lumínica baja de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a una cantidad de $\text{NaNO}_3$ 2.94mMol y de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a 25 y 32°C**

Olguín y colaboradores (2001), reportaron que el contenido de lípidos totales de *Spirulina sp.* (*Arthrospira*) aumentó de 8% a 28.6% del peso seco, cuando se sometió a una limitación por N y además se cultivó a una intensidad luminosa muy baja ( $66 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) en un medio complejo. Al disminuir la intensidad lumínica en los cultivos encontramos una cepa muy interesante siendo esta la A35 que presentó el mayor crecimiento celular cuando fue puesta a crecer en la intensidad de luz mas baja, y por el contrario cuando se incrementaba la intensidad de luz ésta disminuía su crecimiento, además de que los lípidos producidos fueron neutros que aunque fueron en poca cantidad de 35 unidades a 25°C y 20 unidades a 32°C, están arriba del promedio mostrado por la cepa de referencia (22.5 unidades) bajo estas mismas condiciones, por lo que ésta cepa podría tomarse en cuenta,

para llevar cabo un escalamiento debido a su bajo requerimiento de luz, siendo ésto un ahorro importante para la empresa. Por otro lado, otra cepa importante dentro de este parámetro es la cepa A43 que presentó 100 unidades dentro del rango de los lípidos neutros, siendo la mas alta en este experimento, sin embargo, cuando fue puesta a las mismas condiciones pero a 32°C cayo drásticamente y solo generó 7 unidades dentro del rango de los lípidos polares.

#### **4.4.5. Evaluación de lípidos neutros en cepas con medio bristol a una intensidad lumínica alta de 490 $\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ a una cantidadde $\text{NaNO}_3$ 2.94 mMol y de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.28 mMol a 25 y 32°c**

La tasa específica de crecimiento de las microalgas depende de la intensidad de la luz. El crecimiento de las microalgas se incrementa conforme la intensidad de luz aumenta. Cuando la tasa de crecimiento llega a su punto máximo, ésta disminuye con el incremento de la intensidad de la luz debido a la fotoinhibición (Bohne y Linden 2002). Este patrón de crecimiento en relación con la intensidad de la luz se observa en la mayoría las especies de microalgas (Fábregas et al. 1998). Se ha reportado que la producción y acumulación de metabolitos de interés comercial se ve afectada por la radiación de luz blanca en algas, hongos y bacterias (Martin 2010). Sin embargo, la intensidad y el régimen de la iluminación varían con el género de microalga.

En este experimento se incremento la intensidad de luz de 90 a 490  $\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  Encontrando que la cepa A35 elevó la cantidad de lípidos neutros debido a su estrés pero aun se consideran bajos con 48 unidades y la cepa A43 bajo este mismo parámetro presentó 84 unidades siendo menor la cantidad de lípidos neutros en comparación a cuando se utilizó la luz baja.

#### **4.4.6. Evaluación de lípidos neutros en cepas con medio bristol a diferentes concentraciones de NO<sub>3</sub> y PO<sub>4</sub> a 25 y 32°C**

Los principales estímulos físicos son la temperatura y la intensidad luminosa (Cornet y Dussap 2009; Chen et al. 2011; Takache et al. 2012). Por ejemplo, si el nitrógeno está restringido (Chisti 2013), o extremadamente incrementado (Feng et al. 2011), las microalgas tienden a producir más lípidos que carbohidratos. Las concentraciones altas de nitratos y de fosfatos resultaron ser las que provocaron la mayor producción de lípidos tanto en la cepa de referencia *N. oleoabundans* como en 4 cepas de la colección del Instituto de Biotecnología, cuando se pusieron a una concentración alta de NaNO<sub>3</sub> 14.71 mMol y de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.42 mMol a 445 μmol m<sup>-2</sup> seg<sup>-1</sup> la cepa A4 generó 177 unidades la cepa A18 produjo 113 unidades y la cepa A33 registró 169 unidades de índice de fluorescencia (unidades arbitrarias) en comparación a la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 que generó 102 unidades a 25°C. Sin embargo, las cepas A12, A14, A20 y A25 presentaron poco o nulo crecimiento en los fotobiorreactores bajo este mismo parámetro. Además de estos factores, la fase de crecimiento y la edad del cultivo también afectan al contenido y composición de los ácidos grasos, observándose un mayor contenido de lípidos en la fase estacionaria con respecto a la fase logarítmica (Spolaore et al. 2006; Hu et al. 2008).

Por otro lado cuando se usó la misma concentración de nitratos (14.71 mMol) y de fosfatos (6.42 mMol) pero a una intensidad de luz mas alta 490 μmol m<sup>-2</sup> seg<sup>-1</sup> a 25°C la cepa A43 registró la cantidad mas alta de lípidos de todos los experimentos que se llevaron a cabo con 944 unidades, y todos los ácidos grasos fueron generados dentro del rango de los lípidos neutros considerándose esta cepa como la principal candidata para considerarla en realizar un escalamiento a nivel planta piloto para la producción de biocombustibles ahora que se conoce su condición optima de crecimiento y producción de lípidos, mientras que *N. oleoabundans* UTEX 1185 generó solo 58 unidades. Sin embargo, debe señalarse que la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 fue la que registró el 2° lugar en comparación con todas las cepas con una producción de 214 unidades, bajo estas mismas condiciones solo que a una temperatura de 32°C.

Por ultimo, se pudo observar que bajo los diferentes parámetros, se plasmaba una clara influencia no solo en la cantidad de lípidos, sino también en el tipo de ácido graso que producía la cepa en cuestión cambiando de lipido polar a lipido neutro y viceversa. Logrando establecer las condiciones para redirigirlos flujos metabólicos a la acumulación de lípidos neutros.

De hecho, las condiciones óptimas de cultivo dependen de la especie de microalga, cepa, medios de crecimiento, y la geometría del fotobiorreactor (Suknik et al. 1991; Acien Fernandez et al. 1997; Barbosa et al. 2003; Williams y Laurens 2010). Estas condiciones son únicas para cada sistema de cultivo y sólo obtenidas experimentalmente pueden ser confiables (R. Kandilian et al. 2014).

## 4.5 CONCLUSIÓN

La variación de los parámetros analizados (temperatura, cantidad de nutrientes e intensidad de luz) influyó fuertemente el contenido de lípidos en las microalgas. Todas las condiciones de estrés investigadas no sólo condujeron a la acumulación de lípidos y a cambios en la composición de los lípidos neutros y polares, sino también a una variación en el crecimiento, diferente en cada una de las microalgas, lo que podría afectar la productividad de lípidos.

Este estudio también ha demostrado que las microalgas aisladas pueden responder con cambios de manera distinta en el crecimiento y el contenido de lípidos bajo condiciones de estrés de temperatura, nutrientes e intensidad de luz.

Además, este estudio también demostró que la tinción con Rojo Nilo, y analizado mediante un espectrofluorofotómetro se puede identificar con eficacia el cambio en el contenido de lípidos en las células de microalgas en respuesta a los tratamientos de temperatura, nutrientes e intensidad de luz. Ello demuestra que el método de fluorescencia mediante la utilización de Rojo Nilo será una herramienta eficaz para supervisar rápidamente la acumulación de lípidos de microalgas y tendrá aplicaciones para procesos de producción de biocombustibles de microalgas.

Se pudo observar que bajo los diferentes parámetros, se plasmaba una clara influencia no solo en la cantidad de lípidos sino también en el tipo de ácido graso que producía la cepa en cuestión, cambiando de lipido polar a lipido neutro y viceversa.

Finalmente se establecieron las condiciones de estrés y se lograron redirigir los flujos metabólicos a la acumulación de lípidos neutros, siendo estas condiciones únicas para cada especie de microalga.

### EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES Y PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

#### 5.1. INTRODUCTION

Las microalgas se consideran como una alternativa para la producción de biodiesel debido a su rápido crecimiento y su habilidad para acumular grandes cantidades de lípidos. Además de que producen diversos tipos de lípidos que basados en sus estructuras químicas y polaridad, se clasifican en polares (fosfolípidos y glicolípidos) y neutros (mono, di y triacilglicéridos, ceras, carotenoides). Aunque casi todos los tipos de lípidos pueden ser extraídos, sólo los triacilglicéridos pueden ser fácilmente transesterificados en biodiesel por los métodos tradicionales (Gong y Jiang 2011).

La investigación de cepas de microalgas oleaginosas requiere de la medición frecuente del contenido y del análisis del perfil de lípidos. El método convencional más ampliamente utilizado para la determinación de lípidos involucra una extracción con solventes, separación, concentración y determinación gravimétrica (Folch et al. 1957; Bligh y Dyer 1959). El análisis del perfil de lípidos se realiza utilizando métodos cromatográficos ya que proporcionan información de la abundancia de los mismos, además, de que el análisis requiere muestras pequeñas y el método tiene buena reproducibilidad.

Los principales indicadores que determinan el potencial de una microalga para producción de biodiesel son el crecimiento, el contenido de lípidos, el perfil y la productividad de los mismos (Gong y Jiang 2011). Por ello, las características deseables en una microalga es una buena productividad de biomasa en conjunto con un alto contenido de lípidos. Sin embargo, el mayor contenido de lípidos se obtiene bajo condiciones de estrés y bajo estas condiciones la productividad de biomasa disminuye (Su et al. 2010). La intensidad luminosa y los niveles de nitrógeno son los principales



factores que influyen en el contenido de lípidos; en particular, la deficiencia o ausencia de nitrógeno estimula la formación de triacilglicéridos y la intensidad luminosa influye tanto en el tipo de lípidos (neutros o polares) así como en el grado de saturación de los ácidos grasos (Hu et al. 2008).

## 5.2. METODOLOGÍA

### 5.2.1. Extracción de lípidos totales (método gravimétrico)

Se utilizó la técnica descrita por Feng et al. 2011 (Método modificado de Bligh y Dyer, 1959). A partir de biomasa seca y molida de la microalga, se pesaron 50 mg directamente en un tubo de vidrio y se adicionaron 1.8 mL H<sub>2</sub>O, 4 mL Metanol y 2 mL de cloroformo; se mezclaron en vortex durante 30 seg. A continuación, se agregaron 1 mL de cloroformo, 1 mL de H<sub>2</sub>O y nuevamente se mezclaron en vortex por 30 s. Posteriormente, se centrifugó a 4500 rpm por 10 min y al término de ese lapso, se transfirió la fase clorofórmica (localizada en el fondo del tubo) con ayuda de una pipeta pasteur a un tubo limpio. Se repitieron nuevamente los pasos mencionados con la finalidad de obtener una mejor limpieza de la muestra (la fase clorofórmica fue depositada en un tubo previamente puesto a peso constante). Posteriormente, se evaporó el cloroformo en un baño maría a 60° C y después se colocó en una estufa a 60° C por 24 h. Transcurrido este lapso, los tubos fueron colocados en una estufa a 100° C y se pesaron 2 veces al día (mañana y tarde) hasta obtener la estabilidad del peso constante. El cálculo de los lípidos totales se obtuvo derivado de la obtención de la diferencia del peso entre el tubo y el tubo más la muestra.

### 5.2.2 Perfil de ácidos grasos

El análisis de los ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de flama (GC-FID): el extracto de éster metílico se inyectó a un cromatógrafo de gases marcaMS Perkin Elmer Clarus 580 MS Clarus SQ 8. Columna: Elite – 5 MS 30 m x 0.32 mm ID, 0.25 µm. La muestra se sometió a una saponificación, hidrólisis y metilación. Los metil ésteres obtenidos se analizaron por CG-MS, bajo las siguientes condiciones:

- Condiciones Cromatográficas:

Temperatura del Inyector: 250 °C

Temperatura de la Columna: 150 °C - 4 min – 5 °C/min ---- 300 °C -- 10 min

Volumen de Inyección: 3µL

Fase móvil, Helio: 1 mL/min

- Condiciones MS

Energía de Ionización: 70 eV

Temperatura de Transferencia: 280 °C

Temperatura de la Fuente de Ionización: 220 °C

Solvent Delay: 3 min

Scan 0-500 DA

La derivatización se realizó de acuerdo al método de Metcalfe (1963) con algunas modificaciones. De cada una de las muestras se tomaron 200 µL, se disolvieron en 1 mL de hexano, y se adicionaron a cada una de las muestras 10 mL de etanol-éter etílico (3:1 v/v) y 0.2 mL de KOH al 10 N. Las mezclas se colocaron en baño maría a ebullición durante 1 hora manteniendo el etanol a un volumen constante. A la saponificación se le adicionó agua destilada en un volumen para tener 50 % de etanol en agua, se adicionaron 10 mL de éter de petróleo, se mezclaron y se dejaron reposar por 2 horas a 40 °C. Posteriormente, se separaron las fases etérea y acuosa (la fase etérea contiene la materia insaponificable y la fase acuosa las sales de los ácidos grasos), y se extrajeron tres veces evitando pérdidas.

Los ácidos grasos se liberaron adicionando 5 mL de HCl al 1.5 N y se metilaron durante 40 minutos utilizando 0.5 mL de HCl y 5 mL de MeOH a 70 °C, los ésteres metílicos se extrajeron con hexano. La muestra de aceite se aforó a 3 mL (control), mientras que las muestras que contenían las micropartículas se aforaron a 200 µL., de cada una de las muestras se inyectaron 3 µL para su análisis por CG-MS en las condiciones establecidas.

## 5.3. RESULTADOS

### 5.3.1. Método gravimétrico

A partir del procesamiento de la biomasa seca y molida de las microalgas más productivas se obtuvieron los siguientes resultados:

Las cepas con mayor producción de biomasa en gramos por litro fueron la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo condiciones de concentración baja de nitratos y de fosfatos ( $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol) a  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $32^\circ\text{C}$  generando 0.96 g/l y también cuando se hizo crecer a las mismas condiciones pero a una intensidad mas baja de luz  $90\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  también a  $32^\circ\text{C}$  generó 0.83 g/l pero el porcentaje de lípidos fué bajo con un 20.4 y 26.6% respectivamente, mientras que otra de las cepas con mayor producción de biomasa en gramos por litro fue la cepa A43 que bajo condiciones de concentración baja de nitratos y de fosfatos ( $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol) a una intensidad alta de  $490\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  generó 1.23 g/l pero solo generó un 10.2% de lípidos, por otro lado, cuando la misma cepa A43 se puso en condiciones de concentración alta de Nitratos y de Fosfatos ( $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol) a una intensidad alta de  $490\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  generó 0.83 g/l y un 55.3% de lípidos, teniendo esta cepa al parecer, el equilibrio necesario entre la formación de biomasa y la producción lipidica; asimismo, otra cepa que generó una mayor producción de biomasa en gramos por litro fué la cepa A40 que, bajo condiciones de concentración normal de nitratos y de fosfatos ( $\text{NaNO}_3$  2.94 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.28 mMol) a una intensidad normal de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $32^\circ\text{C}$  generó 1.03 g/l pero solo generó un 12.5% de lípidos, mientras que otra cepa la A4 también generó una alta producción de biomasa, bajo condiciones de concentración baja de nitratos y de fosfatos ( $\text{NaNO}_3$  1.47 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.642 mMol) a una intensidad normal de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  generó 0.866 g/l pero solo generó un 7.5% de lípidos, es importante señalar que solamente las cepa A43 y A40 presentaron mayor biomasa que la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (Tabla 5).

Por otro lado, Las cepas con mayor porcentaje de lípidos en el contenido de peso seco, fueron la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo condiciones de concentración alta de nitratos y de fosfatos ( $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol) a una intensidad alta de  $490\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $32^\circ\text{C}$  generando 40% de lípidos pero una baja producción de biomasa con 0.56g/l, mientras que la cepa A4 bajo condiciones de concentración alta de nitratos y de fosfatos ( $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol) a una intensidad normal de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  generó una cantidad de lípidos cercanos a la cantidad producida por la cepa *N. oleoabundans* con 36.6% de lípidos y una producción de biomasa mayor comparada con la cepa de referencia con 0.70g/l, asimismo, la cepa A33 bajo condiciones de concentración alta de nitratos y de fosfatos ( $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol) a una intensidad normal de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  generó una cantidad de lípidos menor a la cantidad producida por la cepa *N. oleoabundans* con 33.3% de lípidos y una producción de biomasa mayor comparada con la cepa de referencia con 0.70g/l, asimismo, la cepa A43 bajo condiciones de concentración alta de nitratos y de fosfatos ( $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol) a una intensidad alta de  $490\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  generó 55.3% de lípidos y una producción de biomasa de 0.83g/l siendo la que generó la mas alta cantidad de lípidos de todas las cepas incluso superando en un 38.25% a la cepa de referencia *N. oleoabundans* (Fig. 82) (Tabla 5).

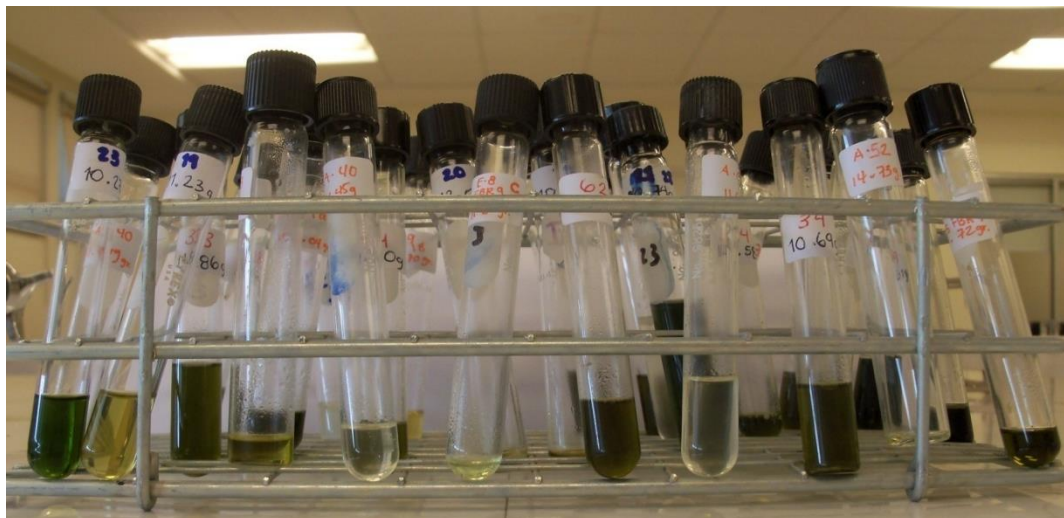
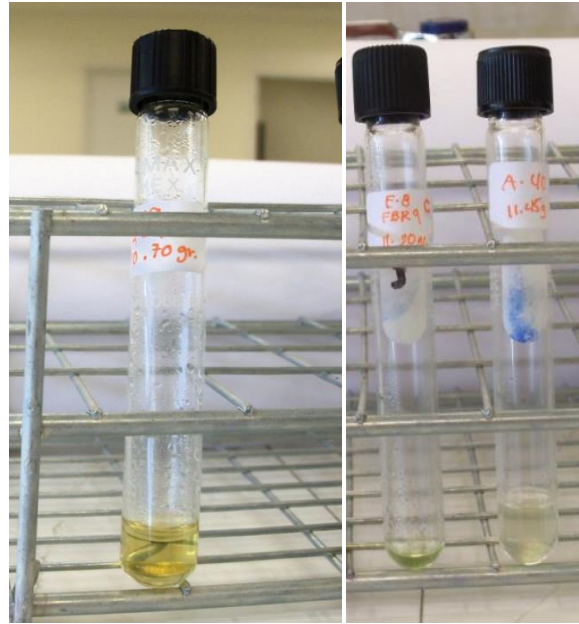


Fig 82 Tubos de ensaye conteniendo lípidos extraídos de las distintas cepas de microalgas

Table 5  
 Contenido y productividad (biomasa/lipidos) para las cepas de microalgas seleccionadas.

Strain ID	Conditions	Temp. °c	Biomass Concentration $g l^{-1}$	lipid Content (% Dwt)	BP ( $mg l^{-1} d^{-1}$ )	LP ( $mg l^{-1} d^{-1}$ )
A68	(Sin estrés)32um	25°	0.34	17.64	24.2	12.60
A68	SB-LN	32°	0.96	20.45	68.5	8.52
A68	SA-LB	32°	0.36	33.33	25.7	33.33
A68	SN-LN	25°	0.49	12.5	35	10.41
A68	SB-LB	32°	0.83	26.66	59.2	34.44
A68	SA-LB	25°	0.53	29.62	37.8	11.39
A68	SA-LA	25°	0.46	23.91	32.8	9.19
A68	SA-LA	32°	0.56	40	40	33.33
A43	Sin estrés 32um	25°	0.30	14.28	21.4	10.20
A43	SN-LN	25°	0.33	21.15	23.5	8.13
A43	SN-LA	25°	0.30	26.66	21.4	14.81
A43	SN-LB	25°	0.36	31.57	25.7	12.14
A43	SB-LA	25°	1.233	10.2	88	3.64
A43	SN-LA	32°	0.66	5.9	47.1	3.71
A43	SA-LA	25°	0.83	55.30	59.2	46.08
A40	Sin estrés 32um	25°	0.53	20	37.8	14.28
A40	SN-LN	32°	1.03	12.50	73.5	12.5
A52	Sin esrés 32um	25°	0.43	13.26	30.7	9.47
A52	SN-LN	25°	0.66	27.7	47.1	27.77
A54	Sin esrés 32um	25°	0.32	18.18	22.8	12.98
A54	SN-LN	25°	0.43	19.78	30.7	14.12
A4	Sin esrés 32um	25°	0.53	11.57	37.8	8.27
A4	SB-LN	25°	0.866	7.56	61.8	3.78
A4	SA-LN	25°	0.70	36.66	50	36.66
A18	Sin esrés 32um	25°	0.40	12.30	28.5	8.79
A18	SA-LN	25°	0.33	28.31	23.5	28.31
A33	SA-LN	25°	0.70	33.3	50	18.51

Nota: LB=  $90\mu mol m^{-2} seg^{-1}$ , LN=  $445\mu mol m^{-2} seg^{-1}$ , LA=  $490\mu mol m^{-2} seg^{-1}$ , SB= Efecto de fosfato  $KH_2PO_4$  a ( $0.642mMol$ ) y nitrato  $NaNO_3$  ( $1.47mMol$ ), SN= Efecto de fosfato  $KH_2PO_4$  a ( $1.29mMol$ ) y nitrato  $NaNO_3$  ( $2.94mMol$ ), SA= Efecto de fosfato  $KH_2PO_4$  a ( $6.42mMol$ ) y nitrato  $NaNO_3$  ( $14.71mMol$ ).

La intensidad de fluorescencia relativa en las células teñidas con Rojo Nilo se correlacionó con el contenido de lípidos intracelular, determinado por gravimetría. La cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) bajo condiciones de concentración alta de nitratos y de fosfatos ( $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol) a una intensidad alta de  $490\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $32^\circ\text{C}$  presentó un 40% de contenido de lípidos y una intensidad de fluorescencia de 214 unidades (u.a.) (Tabla 3 y Fig. 62), mientras que la cepa A4 bajo condiciones de concentración alta de nitratos y de fosfatos ( $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol) a una intensidad normal de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  presentó un 36.6% de contenido de lípidos y una intensidad de fluorescencia de 177 unidades (u.a.), asimismo, la cepa A33 bajo condiciones de concentración alta de nitratos y de fosfatos ( $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol) a una intensidad normal de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  presentó un 33.3% de contenido de lípidos y una intensidad de fluorescencia de 169 unidades (u.a.), también la cepa A18 bajo condiciones de concentración alta de nitratos y de fosfatos ( $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol) a una intensidad normal de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  presentó un 28.3% de contenido de lípidos y una intensidad de fluorescencia de 113 unidades (u.a.) (Tabla 6). Finalmente, la cepa A43 tiene el más alto contenido de lípidos con 55.3% y la intensidad más alta de fluorescencia con 944 unidades de índice de fluorescencia (u.a.), bajo condiciones de concentración alta de nitratos y de fosfatos ( $\text{NaNO}_3$  14.71 mMol y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.42 mMol) a una intensidad alta de  $490\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ , siendo mayor que la cepa de referencia *N. oleoabundans* (Tabla 6 y Fig. 72).



Table 6

Comparación del contenido de lípidos determinado por gravimetría y la intensidad de fluorescencia relative bajo diferentes condiciones con y sin estrés en cepas seleccionadas de microalgas.

<b>Cepa ID</b>	<b>Condiciones</b>	<b>Temp. °C</b>	<b>Lipid Content (% Dwt)</b>	<b>Intensidad Fluorescencia Relativa</b>
<b>A68</b>	Sin estrés	25°	17.64	21
<b>A68</b>	SB-LN	32°	20.45	43
<b>A68</b>	SA-LB	32°	33.33	177
<b>A68</b>	SN-LN	25°	12.5	20
<b>A68</b>	SB-LB	32°	26.66	95
<b>A68</b>	SA-LB	25°	29.62	102
<b>A68</b>	SA-LA	25°	23.91	58
<b>A68</b>	SA-LA	32°	40	214
<b>A43</b>	Sin estrés	25°	14.28	25
<b>A43</b>	SN-LN	25°	21.15	51
<b>A43</b>	SN-LA	25°	26.66	84
<b>A43</b>	SN-LB	25°	31.57	100
<b>A43</b>	SB-LA	25°	10.2	17
<b>A43</b>	SN-LA	32°	5.9	5
<b>A43</b>	SA-LA	25°	55.30	944
<b>A40</b>	Sin estrés	25°	20	38
<b>A40</b>	SN-LN	32°	12.50	29
<b>A52</b>	Sin estrés	25°	13.26	30
<b>A52</b>	SN-LN	25°	27.7	76
<b>A54</b>	Sin estrés	25°	18.18	31
<b>A54</b>	SN-LN	25°	19.78	55
<b>A4</b>	Sin estrés	25°	11.57	23
<b>A4</b>	SB-LN	25°	7.56	15
<b>A4</b>	SA-LN	25°	36.66	177
<b>A18</b>	Sin estrés	25°	12.30	21
<b>A18</b>	SA-LN	25°	28.31	113
<b>A33</b>	SA-LN	25°	33.3	169

Notas A: Células de microalgas teñidas fueron excitadas a 480nm y su intensidad de fluorescencia relativa fue detectada en una banda de emisión de 570-580nm. Notas B: Sin estrés=  $32\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , LB=  $90\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , LN=  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , LA=  $490\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , SB= Efecto de fosfato  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a ( $0.642\text{mMol}$ ) y nitrato  $\text{NaNO}_3$  ( $1.47\text{mMol}$ ), SN= Efecto de fosfato  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a ( $1.29\text{mMol}$ ) y nitrato  $\text{NaNO}_3$  ( $2.94\text{mMol}$ ), SA= Efecto de fosfato  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a ( $6.42\text{mMol}$ ) y nitrato  $\text{NaNO}_3$  ( $14.71\text{mMol}$ ).

### 5.3.2. Perfil de ácidos grasos

El análisis de los ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de flama (GC-FID) a las muestras A33, A4, A18, A43 junto con la cepa de referencia *N. oleoabundans*. Todas bajo condiciones de estrés, asimismo también se evaluó la cepa A43 pero sin estrés obteniéndose los siguientes resultados:

El compuesto lipídico encontrado en la cepa A33 puesta a crecer bajo condiciones de estrés, las cuales fueron concentraciones altas de fosfatos 6.42 mM y de nitratos 14.71 mM a una intensidad lumínica de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$  fue uno, un ácido graso saturado, siendo este el Ácido Palmítico en un 100% (Fig 83) (Tabla 7).

Asimismo, el compuesto lipídico encontrado en la cepa A4 puesta a crecer también bajo las mismas condiciones de estrés (concentraciones altas de fosfatos 6.42 mM y nitratos 14.71 mM y a una intensidad de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ) fue también de 1, igualmente el Ácido Palmítico (ácido graso saturado) en un 100% (Fig 84) (Tabla 8).

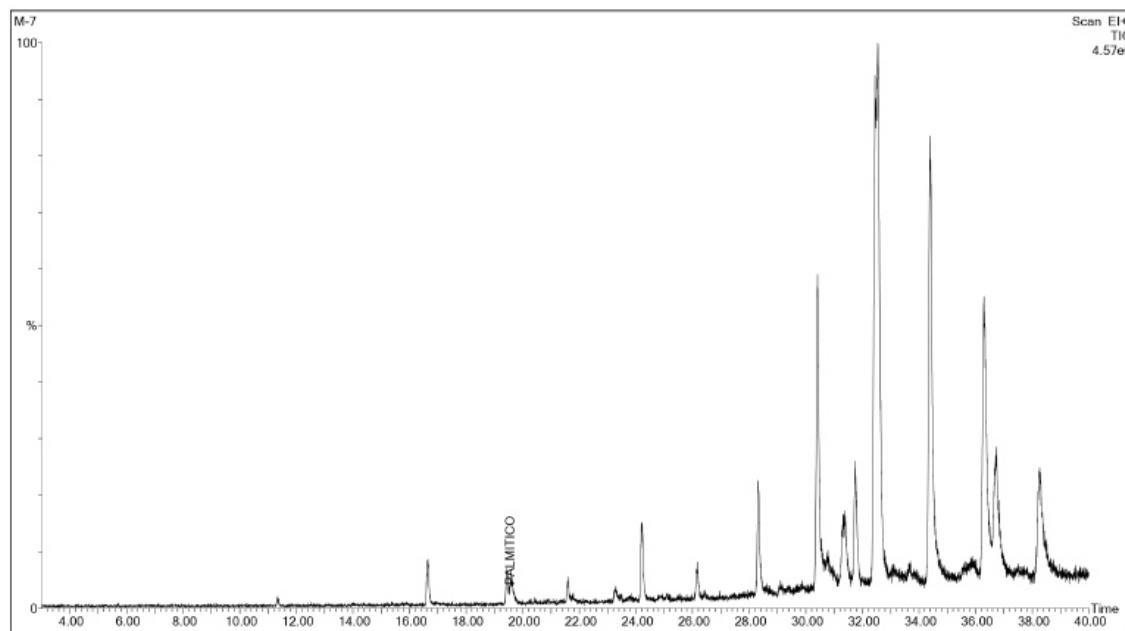


Fig83 .- Cromatograma de ácido graso de la Cepa A33 con estrés (Fosfatos 6.42 mM y Nitratos 14.71 mM a una intensidad de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ )

Tabla 7. Lípidos identificados en la muestra A33 puesta a crecer bajo condiciones de estrés (Fosfatos 6.42 mM y de Nitratos 14.71 mM a una intensidad lumínica de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ )

#	Name	RT	Scan	Area	Height	mg/ml	%	Saturation
1	PALMITICO	19.530	3305	551.7	30.137	0.092	100	16:0 SFA

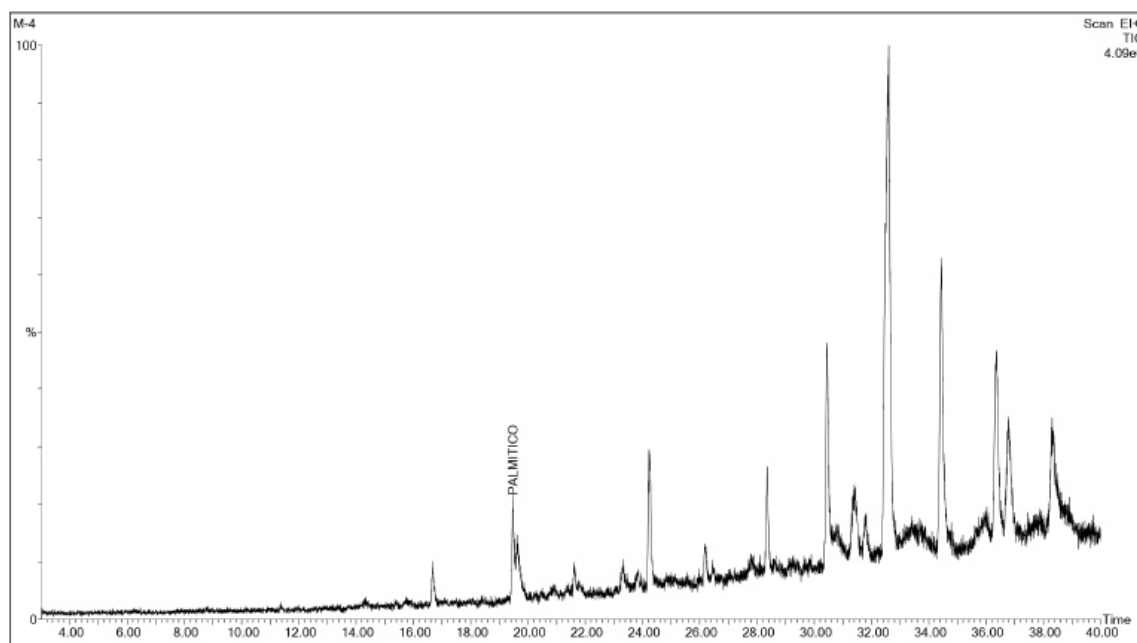


Fig 84.- Cromatograma de ácido graso de la Cepa A4 con estrés (Fosfatos 6.42 mM y Nitratos 14.71 mM a una intensidad de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ )

Tabla 8. Lípidos identificados en la muestra A4 puesta a crecer bajo condiciones de estrés (Fosfatos 6.42 mM y Nitratos 14.71 mM a una intensidad de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ )

#	Name	RT	Scan	Area	Height	mg/ml	%	Saturation
1	PALMITICO	19.475	3294	19,198.5	233,259	0.099	100	16:0 SFA

Mientras que los compuestos lipídicos encontrados en la cepa A18 bajo condiciones altas de fosfatos 6.42 mM y nitratos 14.71 mM a una intensidad de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a

25°C (condiciones de estrés) fueron 4, el Ácido Palmítico (Ác. Graso saturado) en un 42.38%, el Ácido Linoléico (Äc. graso poliinsaturado) en un 11.73%, el Ácido Oleico (Ác. graso monoinsaturado) con un 8.36%, así como el Ácido Estearico (Ac. Graso saturado) en un 37.51%, dando un total de 79.89% de Äc. grasos saturados, 8.36% de Äc. grasos monoinsaturados y 11.73% de Äc. grasos poliinsaturados) (Fig 85 ) (Tabla 9)

Asimismo los compuestos lipídicos encontrados en la cepa A43 pero puesta a crecer en ausencia de condiciones de estrés (fosfatos 1.28 mM y nitratos 2.94 mM a una intensidad lumínica de  $32\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a 25°C) generó 2 Ácidos grasos siendo el ácido Palmítico (Ácido graso saturado) en un 88%, así como también el Ácido Oleico (Äc. graso monoinsaturado) en un 12% (Fig 86 ) (Tabla 10)

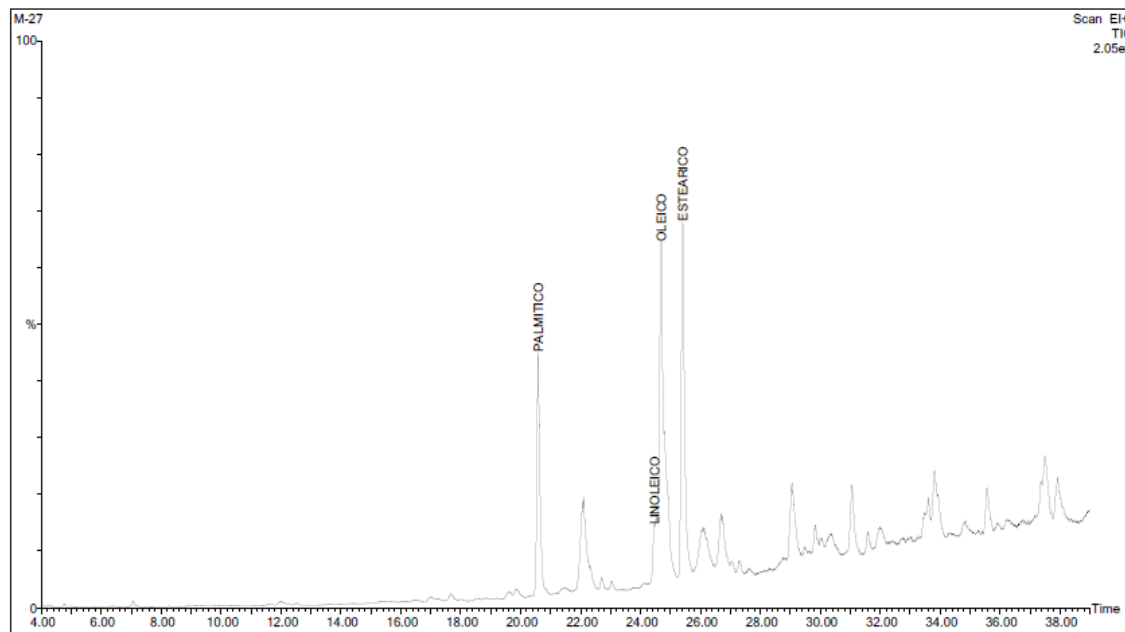


Fig 85.- Cromatograma de aceite de la Cepa A18con estrés (Fosfatos 6.42 mM y Nitratos 14.71 mM a una intensidad de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a 25°C)

:  
Tabla 9. Lípidos identificados en la muestra A18 puesta a crecer bajo condiciones de estrés (Fosfatos 6.42 mM y Nitratos 14.71 mM a una intensidad de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a 25°C)

#	Name	RT	Scan	Area	Height	mg/ml	%	Saturation
1	PALMITICO	20.578	2636	20,703,990.0	366,380,768	0.052	42.38	16:0 SFA
2	LINOLEICO	24.453	3217	3,024,811.0	25,951,286	0.014	11.73	18:2 PUFA
3	OLEICO	24.746	3261	3,277,753.5	95,350,864	0.010	8.56	18:1 MUFA
4	ESTEARICO	25.413	3361	30,155,676.0	489,127,456	0.046	37.51	18:0 SFA

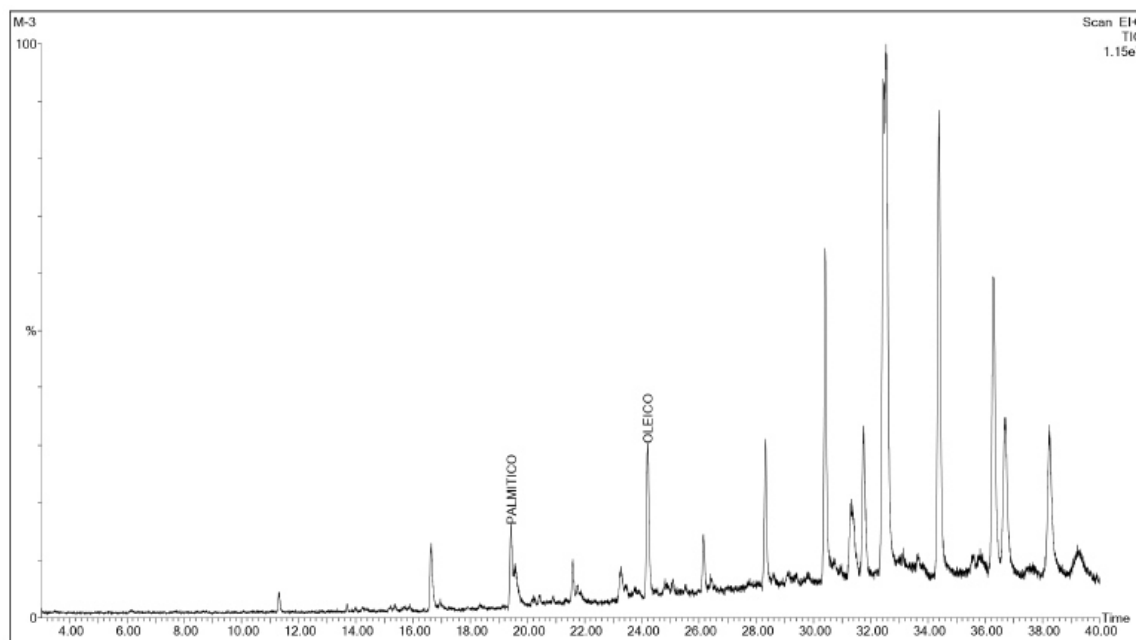


Fig 86.- Cromatograma de aceite de la Ceba A43 sin estrés (Fosfatos 1.28 mM y Nitratos 2.94 mM a una intensidad de  $32\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ )

Tabla 10. Lípidos identificados en la muestra A43 puesta a crecer sin condiciones de estrés (Fosfatos 1.28 mM y Nitratos 2.94 mM a una intensidad de  $32\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ )

#	Name	RT	Scan	Area	Height	mg/ml	%	Saturation
1	PALMITICO	19.430	3285	51,334.7	535,275	0.110	88	16:0 SFA
2	OLEICO	24.202	4239	81,119.3	757,498	0.015	12	18:1 PUFA

Por otro lado los compuestos lipídicos encontrados en lamisma cepa A43 pero ahora bajo estrés, siendo estas condiciones altas de fosfatos 6.42 mM y nitratos 14.71 mM y a una intensidad lumínica alta de  $490\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$  fueron 6 los Ácidos grasos que

se generaron, el Ácido Miristoleico (Ác. graso monoinsaturado) en un 0.05%, también el Ác. Mirístico (Ác. graso saturado) en un 24.66%, además el Ác. Palmitoleico (Ác. graso monoinsaturado) en un 1.49%, así como el Ácido Palmítico (Ac. Graso saturado) en un 24.92%, además el Ácido Linoléico (Äc. graso poli- insaturado) en un 24.31% y por último el Ácido Oléico (Ác. graso monoinsaturado) con un 24.56%, dando un total de 49.58% de Ác. grasos saturados, 26.1% de Ác. grasos monoinsaturados y 24.31% de Äc. grasos poliinsaturados) (Fig 87 ) (Tabla11). Fue la única cepa que bajo estas condiciones generó la mayor cantidad de ácidos grasos con 6, en comparación a los 2 ácidos grasos producidos cuando la misma cepa se hizo crecer sin condiciones de estrés.

Asimismo, los compuestos lipídicos encontrados en la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) puesta a crecer bajo estrés, en condiciones altas de Fosfatos 6.42 mM y de Nitratos 14.71 mM y a una intensidad lumínica baja de  $90\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a 25°C, fueron 4 Ácidos grasos, el Ácido Palmítico (Ac. Graso saturado) en un 32.39%, el Ácido Linoléico (Äc. graso poliinsaturado) en un 4.83%, el Ácido Oleico (Ác. graso monoinsaturado) con un 7.65%, así como el Ácido Estearico (Ac. Graso saturado) en un 55.11%, dando un total de 87.5% de Ác. grasos saturados, 7.65% de Ác. grasos monoinsaturados y 4.83% de Äc. grasos poliinsaturados) (Fig 88 ) (Tabla12)

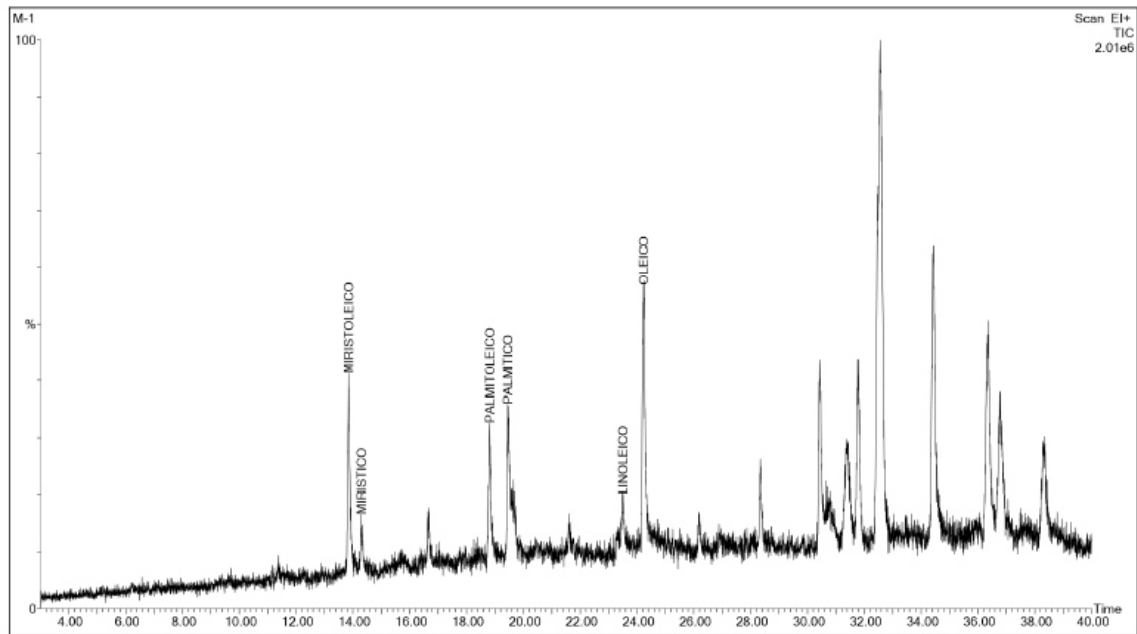


Fig 87.- Cromatograma de aceite de la Ceba A43 con estrés (Fosfatos 6.42 mM y Nitratos 14.71 mM a una intensidad de  $490\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ )

Tabla 11. Lípidos identificados en la muestra A43 puesta a crecer bajo condiciones de estrés (Fosfatos 6.42 mM y Nitratos 14.71 mM a una intensidad de  $490\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ )

#	Name	RT	Scan	Area	Height	mg/ml	%	Saturation
1	MIRISTOLEICO	13.848	2169	9,072.9	125,944	0.049	0.05	14:1 MUFA
2	MIRISTICO	14.298	2259	897.8	54,312	2.368	24.66	14:0 SFA
3	PALMITOLEICO	18.810	3161	6,385.9	89,279	0.137	1.49	16:1 MUFA
4	PALMITICO	19.445	3288	8,791.8	179,249	2.393	24.92	16:0 SFA
5	LINOLEICO	23.492	4097	2,382.3	36,475	2.335	24.31	18:2 PUFA
6	OLEICO	24.227	4244	24,614.4	291,411	2.359	24.56	18:1 MUFA

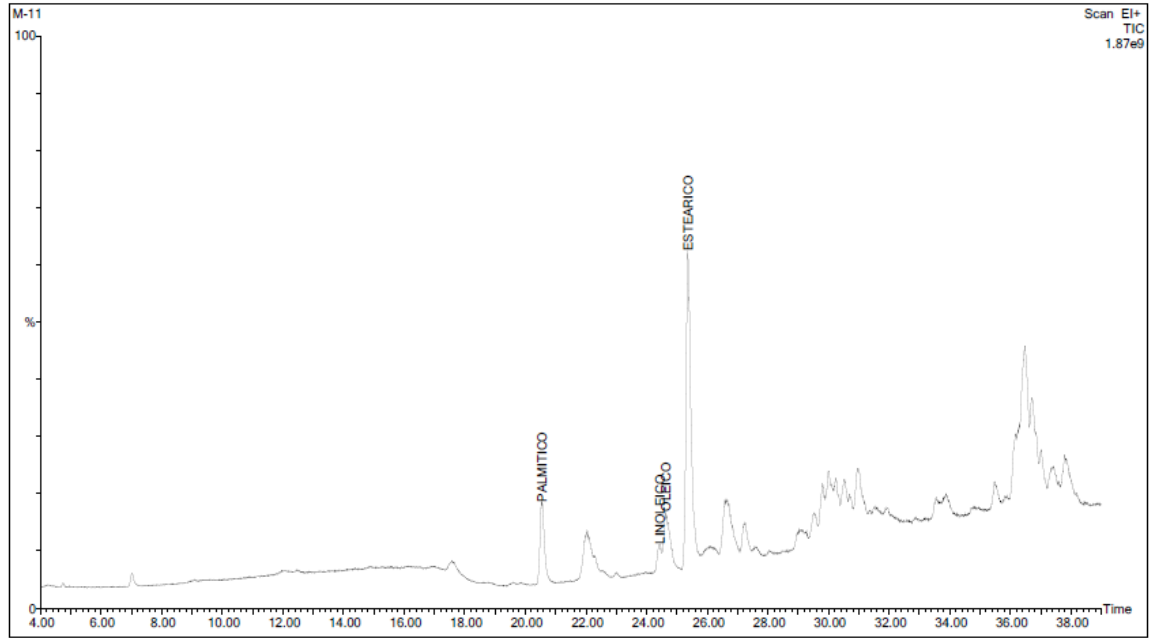


Fig88.- Cromatograma de aceite de la Cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) con estrés (Fosfatos 6.42 mM y Nitratos 14.71 mM a una intensidad de  $90\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ )

Tabla12. Lípidos identificados en la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185 (A68) puesta a crecer bajo condiciones de estrés (Fosfatos 6.42 mM y Nitratos 14.71 mM a una intensidad de  $90\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ )

#	Name	RT	Scan	Area	Height	mg/ml	%	Saturation
1	PALMITICO	20.531	2629	19,430,340.0	118,731,920	0.048	32.39	16:0 SFA
2	LINOLEICO	24.433	3214	1,520,426.8	17,125,300	0.007	4.83	18:2 PUFA
3	OLEICO	24.626	3243	3,706,248.0	30,447,506	0.011	7.65	18:1 MUFA
4	ESTEARICO	25.360	3353	54,468,600.0	420,071,712	0.083	55.11	18:0 SFA



## 5.4. DISCUSIÓN

### 5.4.1. Extracción de lípidos totales (método gravimétrico)

La investigación de cepas de microalgas oleaginosas requiere de la medición frecuente del contenido y del análisis del perfil de lípidos. El método convencional más ampliamente utilizado para la determinación de lípidos involucra una extracción con solventes, separación, concentración y determinación gravimétrica (Folch et al. 1957; Bligh y Dyer 1959).

Las microalgas oleaginosas han recibido una considerable atención, como una fuente renovable de aceite para la producción de biodiesel y otros combustibles. Algunos lípidos de microalgas son ingredientes ya valorados en acuicultura y como suplemento nutricional para los seres humanos. Sin embargo, las microalgas son conocidas por sintetizar una diversidad de compuestos lipídicos inusuales que pueden ser comercialmente explotables y han sido propuestos como una adecuada materia prima para biorrefinería por el valor agregado a la co-producción de productos de químicos finos y combustibles. Si bien pueden existir métodos analíticos específicos para compuestos de lípidos seleccionados, la extracción de lípidos totales es favorable, cuando se busca detectar una variedad de lípidos. Los métodos de extracción ideados por Folch et al. Y por Bligh y Dyer. Han encontrado una aceptación general como procedimientos estándar, para la recuperación de lípidos totales. Ambos métodos se basan en cloroformo y metanol para formar un sistema disolvente monofásico para extraer y disolver los lípidos. Un sistema bifásico es después producido, en una etapa de purificación mediante la adición de agua, lo que lleva a la separación de compuestos polares y no polares en una fase superior e inferior, respectivamente (Axelsson y Gentili 2014). Al terminar la separación bifásica, lípidos neutros y polares se quedarán principalmente en la fase orgánica (una mezcla de disolvente orgánico no polar y disolvente orgánico polar), mientras que la fase acuosa (una mezcla de agua y disolvente orgánico polar) contendrán contaminantes principalmente no lipídicos (proteínas y carbohidratos). El método de Folch et al. Se considera como el método más fiable, para la recuperación completa de los lípidos totales, pero el procedimiento de

Bligh y Dyer es más ampliamente conocido y ha sido favorecido por la extracción de lípidos, de los tejidos de plantas vasculares. También es el método más comúnmente utilizado, pero a menudo ha sido incorrectamente aplicado que resulta en una recuperación incompleta. Mientras que los perfiles de ácidos grasos pueden permanecer intactos, el método subestima sistemáticamente concentraciones en las muestras que contienen más de 2% de lípidos. Esta limitación es importante tener en cuenta en la investigación de microalgas, como en microalgas oleaginosas que contienen un promedio de 25.5% de lípidos en peso seco durante circunstancias normales y 45.7% cuando se somete a estrés (Axelsson y Gentili 2014)

Al realizarse la extracción de los lípidos totales, encontramos que la cepa de referencia *N. oleoabundans* genera una importante cantidad de lípidos bajo 3 condiciones de estrés diferentes; cuando se puso a una concentración alta de fosfatos 6.42 mM y nitratos 14.71 mM y a una intensidad lumínica baja de  $90\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a 25°C generó un 29.6% de lípidos y una biomasa de 0.53g/l, asimismo, cuando solo se le incrementó la temperatura al fotobiorreactor, es decir, se puso bajo las mismas condiciones (concentración alta de Fosfatos 6.42 mM y Nitratos 14.71 mM y a una intensidad lumínica baja de  $90\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ) pero a 32°C generó un 33% de lípidos y una biomasa de 0.36g/l teniendo un incremento del 12.5% en la cantidad de lípidos producida; Además, cuando a la misma cepa de referencia, bajo las mismas condiciones pero se le incrementó la intensidad lumínica (concentración alta de fosfatos 6.42 mM y nitratos 14.71 mM pero a una intensidad lumínica mas alta de  $490\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a 32°C) generó un 40% de lípidos y una biomasa de 0.56g/l. Teniendo ahora un incremento del 20.1% en la cantidad de lípidos producidos, bajo esta condición fue como se obtuvieron los mejores resultados de la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185.

Por otro lado, la cepa A4 en condiciones altas de fosfatos 6.42 mM y nitratos 14.71 mM y a una intensidad lumínica normal de  $445\mu\text{molm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  a 25°C generó un 36.6% de lípidos y una biomasa de 0.70g/l estando a solo un 9.2% por debajo de la máxima cantidad de lípidos producida por la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185, pero generando 25% mas cantidad de biomasa que *N. oleoabundans*, lo cual sería muy

importante de tener en cuenta ya que eso compensaría el 9.2% y en la extracción final del total de la biomasa se tendría una cantidad mayor que *N. oleoabundans*. Asimismo, la cepa A33 bajo los mismos parámetros, condiciones altas de Fosfatos 6.42 mM y Nitratos 14.71 mM y a una intensidad lumínica normal de  $445\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a 25°C generó un 33.3% de lípidos y una biomasa de 0.70g/l. estando solo 20.1% por debajo de la máxima cantidad de lípidos producida por la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185, pero generando 25% mas cantidad de biomasa que *N. oleoabundans*. Y al igual que la cepa anterior, la mayor generación de biomasa ayuda a compensar la diferencia en el porcentaje lípidico en comparación con *N. oleoabundans*. Por otro lado, la cepa A43 en condiciones altas de Fosfatos 6.42 mM y Nitratos 14.71 mM y a una intensidad lumínica alta de  $490\mu\text{molm}^2\text{seg}^{-1}$  a 25°C generó un 55.3% de lípidos y una biomasa de 0.83g/l.superando en un 38.2% la máxima cantidad de lípidos producida por la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185, asimismo generando un 48.2% mas cantidad de biomasa que *N. oleoabundans*.

Cabe señalar que solamente 3 cepas estuvieron a la altura de la cepa de referencia *N. oleoabundans* UTEX 1185, las cuales fueron A4, A33 y A43 considerandose esta última, como candidata para llevar a cabo un siguiente nivel de escalamiento, debido a que ahora se conocen los parámetros óptimos en los que presenta una mayor cantidad de lípidos, y a los resultados mostrados, los cuales superan ampliamente la cepa de referencia *N. oleoabundans*UTEX 1185 bajo estos parámetros de estrés.

#### **5.4.2 Perfil de ácidos grasos**

En una industria basada en microalgas para producción de aceite, una alta productividad de aceite es crucial para lograr la viabilidad comercial. Si bien las condiciones de crecimiento (Por ejemplo, la radiación solar y la temperatura) y el manejo de los cultivos son importantes, el microorganismo adecuado es fundamental para producir la calidad y la cantidad deseada de aceite. Una adecuada cepa de microalgas debe tener una alta productividad de lípidos, ya sea porque posee un alto contenido de lípidos basales y / o

por ser inducible a acumular cantidades significativas de lípidos. La cepa seleccionada también debe cosecharse fácilmente, ser susceptible a una extracción de aceite eficiente y lo suficientemente flexible como para adaptarse a los cambios físico-químicos de las condiciones ambientales. El muestreo es enfocado donde el microclima se altera frecuentemente entre un crecimiento en condiciones óptimas y condiciones desfavorables (por ejemplo, bajos nutrientes, condiciones de microoxigenación, anaerobiosis, luz alta/baja o climas secos, fríos o calientes o cambios rápidos en la salinidad). El muestreo en estos lugares se considera ventajoso debido a que las condiciones subóptimas requeriría que las algas acumularan foto-asimilados tales como almidón o lípidos que tienen una importante función de almacenamiento para sobrevivir, lo que aumenta las posibilidades de obtener cepas con alto contenido de lípidos (Lim et al. 2012).

En base a esto, en este trabajo se procedió a realizar la colecta en zonas, principalmente del estado de Nuevo Leon, el cual reúne este tipo de características presentando un medio ambiente en donde el microclima se altera frecuentemente, entre un crecimiento en condiciones óptimas y condiciones desfavorables, con muchos cambios, inclusive con diferencia de horas, que van desde climas de calor extremo a bajas temperaturas, de ambientes húmedos a secos, baja cantidad de nutrientes, zonas áridas, luz alta /baja, presentando temperaturas arriba de los 40°C en verano y de 1-5°C en invierno.

Los ácidos grasos de las microalgas van de 12 a 22 carbonos de longitud y pueden ser saturados o insaturados. El número de dobles enlaces en las cadenas de ácidos grasos, sin embargo, nunca excede 6 y casi todos los ácidos grasos insaturados son isómeros *cis*. *T. suecica* es una microalga verde común y se utiliza su perfil de ácidos grasos como un ejemplo para ilustrar la idoneidad de los lípidos de microalgas para la síntesis de biodiesel. Tener C16: 0, C18: 1 y C18: 2 como sus ácidos grasos principales, los lípidos de *Tetraselmis* parecen tener el perfil de ácidos grasos necesarios para la conversión a biodiesel de alta calidad, el contenido de ácidos grasos saturados (27.6 %) es relativamente bajo en comparación con el contenido total de insaturados *Cis* (71.6 %). Esto es deseable como FAME derivados de ácidos grasos insaturados *Cis*, ya que a

menudo tienen propiedades ventajosas como mantener el flujo en frío (un punto bajo de enturbiamiento y un punto bajo de congelación). En contraste con las cadenas de ácidos grasos saturados que forman paquete rápidamente una vez que la temperatura disminuye y forma estructuras semicristalinas apretadas, los ácidos grasos insaturados *cis*, impiden la formación del empaquetamiento molecular ordinario debido a las curvas impuestas por los dobles enlaces *cis* y por consiguiente el punto de congelación es a una temperatura mucho más baja. El lípido extraído contiene relativamente una modesta cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) con 4 o más dobles enlaces (C16: 4 siendo el más abundante con el 7.9% en peso.). Los PUFAs altamente insaturados son conocidos por ser responsable de la pobre volatilidad, la baja estabilidad de oxidación, y la tendencia a la formación de goma, observado en algunos biodiesel derivado de semillas oleaginosas. En términos de clases de lípidos, se observa que los acilglicérols en general, tienen un menor grado de insaturación que los lípidos polares y, como tales, son más adecuados para la conversión de biodiesel (Halim et al. 2012). Para la producción de biodiesel, los ácidos grasos con una longitud de cadena de 14 a 18 carbonos son preferibles. Los ácidos grasos saturados C14, C16 y C18 y los ácidos grasos insaturados tales como C16:1, C16:2, C18:1 y C18: 2 son los ácidos grasos más importantes para producir una buena calidad de biodiesel (Van Thang et al. 2015). Esto es porque los ácidos grasos insaturados con 3 o 4 enlaces dobles tienen una estabilidad reducida en el almacenamiento (Van Thang et al. 2015).

Al Comparar nuestros resultados con los de la microalga *T. suecica*, la cual es utilizada como un ejemplo, para ilustrar la idoneidad de los lípidos de una microalga para la síntesis de biodiesel de alta calidad (Halim et al. 2012).; encontramos que *T. suecica* presenta desde 1 hasta 5 Dobles enlaces en sus cadenas de ácidos grasos, mientras que las cepas A18, A43 y la cepa de referencia *N. oleoabundans* muestran un mejor perfil de lípidos (Tablas 9, 11 y 12), esto debido a que solamente presentan un máximo de 2 dobles enlaces en sus cadenas de ácidos grasos, siendo el ácido linoléico (18:2) con un 11.73%, 24.31% y 4.83% respectivamente; evitando así ácidos grasos altamente insaturados, conocidos por ser responsables de la pobre volatilidad, la baja estabilidad a la oxidación, y la tendencia a la formación de goma.

Además, al comparar el porcentaje del número de dobles enlaces en la cadena de ácidos grasos de *T. suecica*, con las cepas A33, A4, A18, A43 sin estrés, A43 con estrés y con la cepa de referencia *N. oleoabundans* (Tablas 7, 8, 9, 10, 11 y 12) respectivamente, encontramos que *T. suecica* solo presenta un 27.6% de ácidos grasos saturados, sin embargo, presenta un 35% de ácidos grasos con 3-5 dobles enlaces; mientras que, la cepa A33 presenta un 100% de ácidos grasos saturados, la A4 que también generó un 100% de ácidos grasos saturados, la A18 que presentó un 79.89% de ácidos grasos saturados, un 8.56% de monoinsaturados y un 11.73% de poliinsaturados; mientras que la cepa A43 sin estrés generó un 88% de ácidos grasos saturados y un 12% de monoinsaturados; sin embargo, la cepa A43 con estrés, presentó un 49.58% de ácidos grasos saturados, un 26.1% de monoinsaturados y un 24.31% de poliinsaturados; y por último la cepa de referencia *N. oleoabundans* con un 87.5% de ácidos grasos saturados, un 7.65% de monoinsaturados y un 4.83 de poliinsaturados. Cabe resaltar que la cepa A43 bajo estrés, es la que presentó un mejor perfil de lípidos en comparación con *T. suecica* debido a que ésta última generó un 51.2% de ácidos grasos poliinsaturados de hasta 4 y 5 dobles enlaces por cadena, mientras que la cepa A43 bajo estrés, solo generó un 24.31% de ácidos grasos de 2 dobles enlaces, asimismo, también superó a *N. oleoabundans* ya que ésta última presentó un 87.5% de ácidos grasos saturados y por el contrario la cepa A43 con estrés solo generó un 49.58%, siendo ésta cepa, la que generó los ácidos grasos en un mejor equilibrio químico para su transformación a biocombustibles.

Por otro lado, el combustible de avión se compone principalmente de alcanos, cicloalcanos saturados, aromáticos saturados de un máximo de 25% en volumen, olefinas de menos de 5% en volumen, pequeñas cantidades de compuestos heteroatómicos tales como los que comprenden azufre no superior a 4000 ppm en virtud de las normas de EE.UU. (Butnark 2003), hidrocarburos aromáticos e insaturados deben mantenerse a un mínimo para evitar el humo durante la combustión (Speight 1991). El número de átomos de carbono oscila entre 8 y 16 (Berkhous 2007).

Asimismo, la cepa A43 bajo estrés, además de ser la cepa que generó los ácidos grasos con un mejor equilibrio químico para su transformación a biodiesel, también pudiera ser utilizada en la generación de biojet fuel debido a que el 50% de sus lípidos se encuentran dentro del rango requerido para la generación de biojet fuels y con un rango de

monoinsaturación del 26.1%, el cual es necesario, ya que ésta insaturación tiene propiedades ventajosas como mantener el flujo en frío (un punto bajo de enturbiamiento y un punto bajo de congelación). En contraste con las cadenas de ácidos grasos saturados que forman paquete rápidamente una vez que la temperatura disminuye y forma estructuras semicristalinas apretadas, los ácidos grasos insaturados *cis*, impiden la formación del empaquetamiento molecular ordinario debido a las curvas impuestas por los dobles enlaces *cis* y por consiguiente el punto de congelación es a una temperatura mucho más baja. Siendo esto muy importante para los aviones, debido a las bajas temperaturas que experimentan al encontrarse a grandes alturas.

## 5.5. CONCLUSIÓN

La presente investigación permitió descubrir 2 cepas (A4 y A33) con una cantidad de lípidos similar a la producida por la cepa de referencia *N. oleoabundans*, además de otra cepa, la A18 con un perfil de ácidos grasos altamente semejante al mostrado por *N. oleoabundans* y por último una cuarta cepa, la A43 que tuvo una producción lipídica y de biomasa en un mayor porcentaje al generado por *N. oleoabundans*.

Cabe resaltar que la cepa A43 bajo estrés, es la que presentó un mejor perfil de ácidos grasos, con un menor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados en comparación con *T. suecica* utilizada como ejemplo para la síntesis de biodiesel de alta calidad; además de superar también a *N. oleoabundans* generando un menor porcentaje de ácidos grasos saturados en comparación a ésta última.

Finalmente la cepa A43 podría ser de gran importancia ya que esta microalga generó los ácidos grasos en un mejor equilibrio químico entre saturados e insaturados para su transformación a biocombustibles como biodiesel y biojet fuel con propiedades importantes como mantener el flujo en frío, es decir, un punto bajo de enturbiamiento y un punto bajo de congelación.



## 6. PERSPECTIVAS

La presente investigación abre la posibilidad para el desarrollo de procesos biotecnológicos para la producción masiva de distintas cepas de microalgas productoras de una variedad de lípidos, utilizados para la generación de biocombustibles. Específicamente, en futuras investigaciones se pretende llevar el presente trabajo a una escala mayor y desarrollar biocombustibles como biodiesel y biojet fuel

Asimismo, se deben buscar nuevas especies de microalgas en distintos ecosistemas de la naturaleza que superen los resultados (cantidad de lípidos y biomasa) así como los tiempos de producción generados por las cepas aisladas en este trabajo

Por otro lado, se deben buscar tecnologías mas eficientes y económicas, en el rompimiento celular de las microalgas para la liberación de los lípidos. Así como probar diferentes organismos (virus) o compuestos biológicos (enzimas) o químicos que pudieran provocar una secreción de los lípidos por parte del organismo.

Finalmente, las microalgas son productoras de una variedad de productos bioquímicos de alto valor agregado, tales como lípidos, almidón, proteínas o carotenoides. Los cuales pueden ser utilizados por la industria cosmética, alimenticia entre otras; por lo que se propone para investigaciones futuras desarrollar una gran variedad de productos como barras energéticas, suplementos proteicos y cremas antioxidantes.

## 7. REFERENCIAS

- Acien FG, Garcia F, Sanchez JA, Fernandez JM, Molina E. 1997. A model for light distribution and average solar irradiance in side outdoor tubular photobioreactors for the microalgal mass culture. *Biotechnol. Bioeng.* 55:701–714.
- Aiba S. 1982. Growth kinetics of photosynthetic microorganisms. *Adv. Biochem. Eng.* 23, 85-156.
- Alp D, Cirak B. 2012. Biofuels from micro and macroalgae. *Energ Educ Sci Technol Part A Energ Sci Res* 28:719–726
- Amaro HM, Catarina GA, Malcata FX. 2011. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, 88:3402-3410
- Andersen R. 2005. *Algal Culturing Techniques*. USA. Elsevier. Cap 1:1-12
- Andersen RA, Kawachi M. 2005. Traditional Microalgae Isolation Techniques. En: Andersen R.A. (ed), *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press. E.U.A., 83-100pp
- Apt KE y Behrens PW. 1999. Commercial developments in microalgal biotechnology. *J Phycol* 35:215-226.
- ASTM Internacional. <http://www.astm.org>
- Axelsson M, Gentili F. 2014. A Single-Step Method for Rapid Extraction of Total Lipids from Green Microalgae. *PLOS ONE* 9(2): e89643. doi:10.1371/journal.pone.0089643.
- Bannister TT. 1979. Quantitative description of steady state, nutrient – saturated algal growth, including adaptation. *Limnol. Ocea-nogr.* 24:76 – 96.

Barbosa MJ, Hoogakker J, Wijffels RH. 2003. Optimisation of cultivation parameters in photobioreactors for microalgae cultivation using the A-stat technique. *Biomol. Eng.* 20:115–123.

Barbosa MJ, Hadiyanto H and Wijffels RH. 2004. Overcoming shear stress of microalgae cultures in sparged photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 85: 78-85.

Becker EW 1994. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press. Reino Unido. pp. 293

Benemann JR. 2009. Microalgae Biofuels: A Brief Introduction. Disponible en: <http://www.genifuel.com/text/20090723%20Algal%20BiofuelsAn%20Introduction%20by%20John%20Benemann.pdf>

Benemann JR, Weissmann JC, Koopman BL, Oswald WJ. 1977. Energy production by microbial photosynthesis. *Nature*, 268:19-23.

Berkhous SK. 2007. Thermal Oxidative Stability of Coal- Based JP-900 Jet Fuel: Impact on Selected Physical properties.

Bhosale P. 2004. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 351–361.

Bigogno C, Khozin-Goldberg I, Boussiaba S, Vonshaka A, Cohen Z. 2002. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry* 60:497-503.

Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911–917.

Bohne F y Linden H. 2002. Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysic Acta* 1579: 26–34.

Brennan L, Owende P. 2010. Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14:557–577.

Butnark S. 2003. Thermally Stable Coal-Based Jet Fuel: Chemical Composition, Thermal Stability, Physical Properties and Their Relationships.

Canakci M, Sanli H. 2008. Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:431-441.

Carvalho AP, Meireles L, Malcata F. 2006. Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances. *Biotechnol Progr.* 22: 1490-1506

Carver SM, Hulatt CJ, Thomas DN y Tuovinen OH. 2011. Thermophilic, anaerobic co-digestion of microalgal biomass and cellulose for H<sub>2</sub> production. *Biodegradation* 2011, 22:805-814

Chen F and John MR. 1991. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Applied Phycology* 3: 203–209

Chen C, Yeh K, Aisyah R, Lee D, Chang J. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresour. Technol.* 102:71–81.

Chen GQ y Chen F. 2006. Growing phototrophic cells without light. *Biotechnology Letters* 28:607–616.

Chen W, Zhang C, Song L, Sommerfeld M, Hu Q. 2009. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, 77: 41–47.

Chisti Y. 1999. Shear sensitivity. In Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation (Vol. 5) (Flickinger, M.C. and Drew, S.W.,eds). In pp. 2379–2406, Wiley

Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Adv. 25: 294–306.

Chisti Y. 2013. Constraints to commercialization of algal fuels. J. Biotechnol. 167: 201–214.

Chisti Y y Jauregui U. 2002. Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. Biochem. Eng. J. 10: 143-153.

Cooksey KE, Guckert JB, Williams SA, Callis PR. 1987. Fluorometric-determination of the neutral lipid-content of microalgal cells using Nile Red. J Microbiol Meth 6:333–345

Cornet JF y Dussap CG. 2009. A simple and reliable formula for assessment of maximum volumetric productivities in photobioreactors. Biotechnol. Prog.25: 424–435.

Craggs RJ, Heubeck S, Lundquist TJ, Benemann JR. 2011. Algal biofuels from wastewater treatment high rate algal ponds. Water Science and Technology, 63:660-665.

Dan Telah D, Sintov A, Cohen E. 2004. The effect of salt stress on the production of canthaxanthin and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* grown under limited light intensity. World Journal of Microbiology and Biotechnology 20: 483–486.

Del Campo JA, Rodriguez H, Moreno J, Vargas MA, Guerrero R. 2004. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). Applied Microbiology and Biotechnology 64: 848-854.

Dinh LTT, Guo Y, Mannan MS. 2009. Sustainability evaluation of biodiesel production using multicriteria decision-making. *Environ. Prog. Sustain. Energy*. 28: 38–46.

Dismukes GC, Carrieri D, Carrieri D, Bennette N, Ananyev GM, Posewitz MC. 2008. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 19: 235-240.

Doan TTY y Obbard JP. 2011. Improved Nile Red staining of *Nannochloropsis* sp. *Journal of Applied Phycology*, 23:895-901

Domingos Padula A, Silveira dos Santos M, Benedetti Santos OI, Borenstein D. 2014. *Liquid Biofuels: Emergence, Development and Prospects*. Springer-Verlag: London, pp.190-191,

Dragone G, Fernandes BD, Abreu AP, Vicente AA, Teixeira JA. 2011. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy*, 88: 3331-3335.

Fábregas J, Domínguez A, García-Álvarez D, Lamela T y Otero A. 1998. Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters*. 20: 623-626.

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.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497–509

Fortenbery TR. 2004. *Biodiesel Feasibility Study: An Evaluation of Biodiesel Feasibility in Wisconsin Badger Ag Vest Wisconsin Soybean Promotion Board*, Renk Agribusiness Institute, UW- Madison.

Fukuda H, Kondo A, Noda H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng* 92:405-416.

García-Malea MC, Acién FG, Fernández JM, Cerón MC, Molina E. 2006. Continuous production of green cells of *Haematococcus pluvialis*: Modeling of the irradiance effect. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 981–989.

Garibay Hernández A, Vázquez-Duhalt R, Sánchez Saavedra M.P, Serrano Carreón L, Martínez Jiménez A. 2009. Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología* 13:38-66.

Gong Y, Jiang M. 2011. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. *Biotechnol Lett.* 33: 1269–1284

Goss M. 2005. Culture and use of microalgae. *Journal of Nature Studies* 4:1-19 ISSN 1655-3179

Gouveia L, Marques A, Lopes T, Reis A. 2009. *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:821-826

Grobbelaar J, Neddal L, Tichy V. 1996. Influence of high frequency Light/dark fluctuations on photosynthetic characteristics of microalgae photoacclimated to different light intensities and implications for mass algalcultivation *J. Appl. Phycol.* 8:335-343.

Grobbelaar JU. 2000. Physiological and technological considerations for optimizing mass algal cultures. *J. Appl. Phycol.* 12: 201-206.

Gudin C, Chaumont D. 1983. Solar biotechnology study and development of tubular solar receptors for controlled production of photosynthetic cellular biomass. En Palz W, Pirrwitz D (Eds.) *Proceedings of the Workshop and EC Contractor's Meeting in Capri.* Reidel. Dordrecht, Holanda. Pp. 184-193.

Harker M, Tsavalos AJ, and Young AJ. 1996. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology* 68: 197-199

Halim R, Harun R, Danquah M, Paul A, Webley P. 2012. Microalgal cell disruption for biofuel development *Applied Energy* 91:116–121

Harun RM, Singh GM, Forde y Danquah MK. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 1037–1047.

Ho SH, Kondo A, Hasunuma T, Chang JS. 2013. Engineering strategies for improving the CO<sub>2</sub> fixation and carbohydrate productivity of *Scenedesmus obliquus* CNW-N used for bioethanol fermentation. *Bioresource Technology* 143, 163–171.

Hu Q, Guterman H, Richmond A. 1996. A flat inclined modular photobioreactor for outdoor mass cultivation of photoautotrophs. *Biotechnol Bioeng* 51:51-60.

Hu Q y Richmond A. 1996. Productivity and photosynthetic efficiency of *Spirulina platensis* as affected by light intensity, algal density and rate of mixing in a flat plate photobioreactor. *J Appl Phycol* 8:139-145.

Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* 54: 621–639.

Huang GH, Chen G y Chen F. 2009. Rapid screening method for lipid production in alga based on Nile red fluorescence, *Biomass and Bioenergy*, 33:1386-1392.

Imamoglu E, Dalay MC, Sukan FV. 2009. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *New Biotechnology*, 26: 199-204.



Ip P and Chen F. 2005. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Process Biochemistry* 40: 733–738

Janssen M., Winter M, Tramper J, Mur L, Snel J, Wijffels R. 2000. Efficiency of light utilization of *Chlamydomonas reinhardtii* under medium-duration light/dark cycles. *J Biotechnol* 78: 123-37.

John RP, Anisha G, Nampoothiri KM, Pandey A. 2011. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresour Technol* 102:186–193

Jorquera O, Kiperstok A, Sales EA, Embiruçu M, Ghirardi ML. 2010. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, 101: 1406–1413.

Khotimchenko SV, Yakovleva IM. 2005. Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry* 66:73-79.

Kok B. 1953. Experiments on photosynthesis by *Chlorella* in flashing light. In: Burlew JS, Editor. *Algal Culture*. Washington: Carnegie Institution of Washington. p 63-75.

Kommareddy AR y Anderson GA. 2003. Study of light as a parameter in the growth of algae in a photo-bio reactor (PBR). ASAE Paper No. 034057. ASAE, St. Joseph, Michigan.

Kunz A, Oliveira PAV. 2006. Aproveitamento de dejetos de animais para geração de biogás. *Revista de Política Agrícola*, v. 15 (3), p. 28-35. Disponible en: [http://www.embrapa.br/publicacoes/tecnico/revistaAgricola/pol\\_agr\\_03-2006.pdf](http://www.embrapa.br/publicacoes/tecnico/revistaAgricola/pol_agr_03-2006.pdf)(em português) e [http://www.embrapa.br/publicacoes/tecnico/revistaAgricola/RPA\\_03-2006\\_INGLES%20Edicao%202007.pdf](http://www.embrapa.br/publicacoes/tecnico/revistaAgricola/RPA_03-2006_INGLES%20Edicao%202007.pdf)(em inglés)

Kurano N, et al. 1995. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. *Energy Conversion Management*, 36: 689-692

Lakaniemi AM, Hulatt CJ, Thomas DN, Tuovinen OH, Puhakka J. 2011. Biogenic hydrogen and methane production from *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* biomass. *Biotechnology for Biofuels*, 4, 34 doi:10.1186/1754-6834-4-34

Lestari S, Mäki-Arvela P, Beltramini J, Max Lu GQ, Murzin DY. 2009. Transforming triglycerides and fatty acids into biofuels. *ChemSusChem* 2: 1109–1119.

Li Q, Du W, Liu D. 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbial Biotechnol* 80:749-756

Li Y, Horsman M, Dubois-Calero N. 2008. Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress*, 24: 815-820.

Lim DKY, Garg S, Timmins M, Zhang ESB, Thomas-Hall SR et al. 2012. Isolation and Evaluation of Oil-Producing Microalgae from Subtropical Coastal and Brackish Waters. *PLoS ONE* 7(7): e40751. doi:10.1371/journal.pone.0040751

Liu ZY, Wang GC, Zhou BC. 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 99: 4717-4722.

Loera-Quezada M, Olgun E. 2010. Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* 1: 91–116

Majer S, Mueller-Langer F, Zeller V, Kaltschmitt M. 2009. Implications of biodiesel production and utilization on global climate - a literature review. *Eur J Lipid Sci Technol* 111:747-762.

Mandal S, Mallick N. 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84: 281-291.

Markou G, Angelidaki I, Georgakakis D. 2013. Carbohydrate-enriched cyanobacterial biomass as feedstock for bio-methane production through anaerobic digestion. *Fuel* 111: 872–879.

Martin FPH. 2010. Optimization of photobioreactor for astaxanthin production in *Chlorella zofingiensis*. Tesis de Maestría en Ingeniería. National University of Singapore.

Mata T, Martins A, Caetano NS. 2009. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 217–232.

Matsumoto M, Yokouchi H, Suzuki N, Ohata H, Matsunaga T. 2003. Saccharification of marine microalgae using marine bacteria for ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 105: 247–254.

Matsumoto M, Sugiyama H, Maeda Y, Sato R, Tanaka T, Matsunaga T. 2009. Marine diatom, *Navicula* sp Strain JPCC DA0580 and marine green alga, *Chlorella* sp Strain NKG400014 as potential sources for biodiesel production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161: 483-490.

Matthijs HCP, Balke H, Hes van HM, Kroon BMA, Mur LR, Binot RH. 1996. Application of light-emitting diodes in bioreactors: Flashing light effects and energy economy in algal culture (*Chlorella pyrenoidosa*). *Biotechnol Bioeng.* 50:98-107.

Mazucca Sobczuk T, et al. 2006. Effects of agitation on the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Porphyridium cruentum*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 28: 243–250

Mehlitz TH. 2009. Temperature influence and heat management requirements of microalgae cultivation in photobioreactors. Tesis de Maestría. California Polytechnic State University, USA.

Metcalf LD, Scmitz AA. 1961. The rapid preparation of fatty acids esters for gas chromatography analysis. *Analytical Chemistry* 33: 363

Morales E, Rodríguez M, García D, Loreto C, Marco E. 2002. Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC7120 en función del pH y CO<sub>2</sub>. *Interciencia* 27: 373-378.

Moschini G, Cui J, Lapan H. 2012. Economics of biofuels: an overview of policies, impacts and prospects. Working Paper No.12021, May 2012. Iowa State University, Ames, Iowa

Mosqueda-Cano G, Gutierrez-Corona JF. 1995. Environmental and developmental regulation of carotenogenesis in the dimorphic fungus *Mucor rouxii*. *Current Microbiology*. 31: 141–145.

Mulbry W, Kondrad S, Buyer J. 2008. Treatment of dairy and swine manure effluents using freshwater algae: fatty acid content and composition of algal biomass at different manure loading rates. *JAppl Phycol.*, 20: 1079-1085.

Murray J, Thomson A. 1977. Hydrocarbon Production in *Anacystis-Montana* and *Botryococcus-Braunii*. *Phytochemistry*, 16: 465-468.

Nedbal L, Tichy V, Xiong F, Grobbelaar JU. 1996. Microscopic green algae and cyanobacteria in high-frequency intermittent light. *J Appl Phycol* 8:325-333.

Olguín E.J, Galicia S, Angulo-Guerrero O, Hernández E. 2001. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. *Bioresource Technol* 77:19-24.

Persson M, Jonsson O, Wellinger A. 2006. Biogas Upgrading to Vehicle Fuel Standards and Grid Injection, IEA Bioenergy, Task 37 – Energy from Biogas and Landfill Gas. Disponible en: [http://www.iea-biogas.net/Dokumente/upgrading\\_report\\_final.pdf](http://www.iea-biogas.net/Dokumente/upgrading_report_final.pdf)

Philliphs JN, Myers J. 1954. Growth rate of *Chlorella* in flashing light. *Plant Physiol* 29:152161.

Pienkos PT, Darzins A. 2009. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 3: 431-440.

Pirt SL, Lee YK, Walach MR, Pirt MW, Balyuzi HH, Bazin MJ. 1983 A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: Design and performance. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 33: 35-38.

Prescott GW. 1978. *How to Know the Freshwater Algae*. WC Brown/McGraw-Hill, USA.

Prosperi CH. 2000. Cyanobacteria in human affairs. *Interciencia* 25: 303-306

Pruvost J, Van Vooren G, Cogne G, Legrand J. 2009. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource Technology*, 100: 5988-5995.

Pulz O. 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 287-293

Pulz O. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol.* 65:635–64

Rabe AE, Benoit A. 1962. Mean light intensity. A useful concept in correlating growth rates of dense cultures of microalgae. *Biotechnol. Bioeng.* 4: 337 – 390.

Ratledge C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86: 807-815.

Razmig K, Tsu-Chin T, Laurent P. 2014. Control of incident irradiance on a batch operated flat-plate photobioreactor. *Chemical Engineering Science.* 119: 99–108

Richmond A. 2000. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: a personal view. *J. Appl. Phycol.* 12: 441-451.

Rismani-Yazdi H, Haznedaroglu BZ, Bibby K, Peccia J. 2011. Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: Pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels. *BMC Genomics.* 12: 148.

Rodolfi L, Chin Zittelli G, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR. 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 102:100-112.

Ruppert H, Kappas M, Ibendorf J. 2013. Sustainable Bioenergy Production: An Integrated Perspective. In: *Sustainable Bioenergy Production: An Integrated Approach*, Ruppert H, Kappas M, Ibendorf J (eds). Springer: Dordrecht, pp. 5-8

Sánchez MA. et al. 2003. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochem. Eng. J.* 16: 287–297

Sorokin C, Krauss RW. 1958. The Effects of Light Intensity on the Growth Rates of Green Algae. *Plant Physiol.* March 1958 33: 109-113

Scott SA, Davey MP, Dennis JS, Horst I, Howe CJ, Lea-Smith DJ, Smith AG. 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects *Current. Opinion in Biotechnology* 2010, 21:277–286

Shales S. 2007. Biodiesel: a microbiologist's perspective. *Microbiologist* June 26-29.

Sheehan J, Dunahay T, Benemann JR, Roessler PG. 1998. A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species program- biodiesel from algae. National Renewable Energy Laboratory report NREL/TP-580-24190.

Singh A, Nigam PS, Murphy JD. 2011. Mechanism and challenges in commercialization of algal biofuels. *Bioresource Technology.* 102: 26–34.

Singh RN, Sharma S. 2012. Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16: 2347– 2353

Solovchenko AE, Khozin-Goldberg I, Didi-Cohen S, Cohen Z, Merzlyak MN. 2008. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *J Appl Phycol* 20::245-251.

Speight JG. 1991. *The Chemistry and Technology of Petroleum.* 2nd edition, Revised and Expanded by Marcel Dekker Inc. New York, New York.

Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 101:87-96.

Stephenson AI, Dennis JS, Howe CJ, Scott SA, Smith AG. 2010. Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. *Biofuels*. 1:47-58.

Stephenson PG, Moore CM, Terry MJ, Zubkov MV, Bibby TS. 2011. Improving photosynthesis for algal biofuels: toward a green revolution. *Trends in Biotechnology* 29: 615–623.

Stuart AS, Matthew PD, John SD, Irmtraud H, Christopher JH, David JLS, Alison GS. 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology* 2010, 21:277–286

Su CH, Chien LJ, Gomes J, Lin YS, Yu YK, Liou JS, Syu RJ. 2010. Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. *J Appl Phycol* 23: 903-908

Sukenik A, Levy R, Levy Y, Falkowski P, Dubinsky Z. 1991. Optimizing algal biomass production in an outdoor pond: a simulation model. *J. Appl. Phycol.* 3: 191–201.

Takache H, Pruvost J, Cornet JF. 2012. Kinetic modeling of the photosynthetic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in a photobioreactor. *Biotechnol. Prog.* 28: 681–692.

Terry KL, Taymond LP. 1985. System desing for the autotropic production of microalgae. *Enzyme Microb. Technol.* 7:474-487.

Tornabene TG, Holzer G, Lien S, Burris N. 1983. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme Microb Tech* 5:435-440.

Torzillo G, Pushparaj B, Bocci F, Balloni W, Materassi R, Florenzano G. 1986. Production of *Spirulina* biomass in closed photobioreactors. *Biomass* 11: 61-64.



Tredici M. 2004. Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Ed. Amos Richmond. Blackwell Publishing, Ltd. 577 pp.

Ugwu CU, Ogbonna J, Tanaka H. 2002. Improvement of mass transfer characteristics and productivities of the inclined tubular photobioreactors by installation of internal static mixers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58:600-607.

Ugwu CU, Aoyagi H, Uchiyama H. 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technol* 99:4021-4028.

Umarah M, Wajahat H, Ikram-ul H, Kauser AM. 2011. Study of Native Algal Species for Growth Potential and Lipid Yield. *Current Research Journal of Biological Sciences* 3: 240-245,

Us Department Of Energy (DOE). 2010. National Algal Biofuels Technology Roadmap. Washington, DC: U.S. DOE, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program, 2010. 125p. Disponible en: [http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/algal\\_biofuels\\_roadmap.pdf](http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/algal_biofuels_roadmap.pdf)

Van Beilen JB. 2010. Why microalgal biofuels won't save the internal combustion machine. *Biofuels, Bioproducts and Biorefinery*, 4:41–52.

Van Den Hoek C, Mann DG, Jahns HM. 1989. *Algae: An introduction to Phycology*. Cambridge: Cambridge University Press. 627 p

Van Thang D, Yan L, Ekaterina N, Peer MS. 2012. Microalgae Isolation and Selection for Prospective Biodiesel Production. *Energies*. 5: 1835-1849

Van Thang D, Skye R, Thomas-Hall, Peer MS. 2015. Growth and lipid accumulation of microalgae from fluctuating brackish and sea water locations in South East Queensland Australia. *Front Plant Sci.* 6: 359.

Vasudevan PT, Briggs M. 2008. Biodiesel production-current state of the art and challenges. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:421-430.

Vilchez C, Garbayo I, Lobato MV, Vega JM. 1997. Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. *Enzyme Microb. Technol.* 20: 562-572.

Wang L, Wang Y, Chen P, Ruan R. 2010. Semi-continuous cultivation of *Chlorella vulgaris* for treating undigested and digested dairy manures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162: 2324-2332.

Wang X, Liu X, Wang G. 2011. Two-stage hydrolysis of invasive algal feedstock for ethanol fermentation. *J Integr Plant Biol.* 53: 246–252.

Weiland P. 2010 Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 85: 849-860.

Weissman JC, Goebel RP, Benemann JR. 1988. Photobioreactor design: mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation. *Biotechnol. Bioeng.*31:336 – 344.

Williams PJ, Laurens L. 2010. Microalgae as biodiesel and biomass feedstocks: review and analysis of the biochemistry, energetic and economics. *Energy Environ. Sci.* 3: 554–590.

Yang YF, Feng CP, Inamori Y, Maekawa T. 2004. Analysis of energy conversion characteristics in liquefaction of algae. *Resour. Conserv. Recycl.* 43: 21–33.

Zamalloa C, Vulsteke E, Albrecht J, Verstraete W. 2011. The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. *Bioresource Technology* 102: 1149–1158.

## **8. RESUMEN BIOGRÁFICO**

**Ituriel Alejandro Vargas Saldaña**

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

**Tesis:** DESARROLLO DE UN PROCESO Y ESCALAMIENTO A NIVEL LABORATORIO PARA LA PRODUCCIÓN DE MICROALGAS PRODUCTORAS DE LÍPIDOS DE BAJO PESO MOLECULAR USADAS EN LA SÍNTESIS DE BIOCOMBUSTIBLES EN UN FOTOBIOREACTOR TIPO AIR-LIFT

**Campo de estudio:** Biotecnología

**Datos Personales:** Nacido en Monterrey, N.L. el 7 de Octubre de 1967, hijo de Abelino Cesareo Vargas Alanis y Myrna del Socorro Saldaña García

**Educación:** Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el grado obtenido de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 1990

**Experiencia Profesional:** Profesor por horas de la materia de Microbiología Ambiental.

Director Externo de 5 Tesis de Licenciatura y Asesor de 4 Tesis de Licenciatura para un total de 9:

1.-Carlos Omar Flores Sosa

Para obtener el grado de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en Noviembre de 2012

Tesis: Aislamiento e identificación de algas productoras de aceites

2.-David Valdés Mejorado

Para obtener el grado de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en Julio de 2014

Tesis “Determinación de B- caroteno en 3 especies de microalgas de agua dulce del Estado de Nuevo León”

3.-Hiram Isai Mendoza Hernandez

Para obtener el grado de Licenciado en Biotecnología Genómica en Agosto de 2014

Tesis: “Aumento de la producción de biogás mediante pretratamiento; térmico-químico sobre residuos organicos de desechos (suero de leche y levadura cervecera) en fase líquida”

4.-Magda Patricia Vargas Pérez

Para obtener el grado de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en Enero 2015

Tesis: Efecto de distintos tipos de estrés sobre la producción de lípidos neutros para biojet-fuel en cepas de microalgas del estado de Nuevo León.

5.- Guillermo Antonio Matamoros Orona

Para obtener el grado de Licenciado en Biotecnología Genómica en Marzo-2015

Tesis: “Análisis de la producción de biogás bajo el esquema de pre-tratamiento térmico y químico sobre residuos orgánicos ganaderos y de la industria panificadora”

Asesor de 4 Tesis de Licenciatura:

1.- Raymundo Pedraza

Para obtener el grado de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en Junio 2015

Título: “Determinación analítica de B-caroteno en tres especies de microalgas dulceacuícolas del estado de Nuevo León”

2.- Eduardo Azareel Quintanar Alvarado

Para obtener el grado de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2015

Tesis: “Análisis de proteína microalgal de especies nativas del Estado de Nuevo León”

3.- Alejandro Ivan Saucedo Reyes

Para obtener el grado de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en Octubre 2016

4.- Nallely Marlene Medina Torres

Para obtener el grado de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en Octubre 2016

## **10. ARTICULO PUBLICADO**