



UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL PERÚ

Facultad de Ciencias e Ingeniería

Escuela Profesional de Ecología

TESIS

**EFFECTO DE DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICION DE CO₂ EN
LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS
TOTALES DE CUATRO ESPECIES DE MICROALGAS
AMAZÓNICAS**

Presentado por:

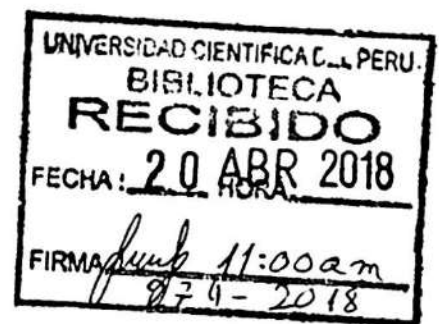
María Zadith Casuso Wong

Tesis para optar Título Profesional de:

LICENCIADO EN ECOLOGIA

SAN JUAN - PERU

2015



DEDICATORIA

A mi madre y abuelos

Claudia, María y Ramón, por haberme apoyado incondicionalmente en toda mi etapa de estudiante, exigiéndome siempre superación personal y ayudándome a cumplir mis metas y sueños. Por formar en mí a alguien con aspiraciones y valores y por hacer de mis sueños los suyos propios.

A mis hermanos

Ramón y Claudia, con quienes desde muy pequeños aprendí la competencia, desarrollando valores de tolerancia y respeto, además de que a sus corta edad, me enseñaron a luchar por mis sueños, y que a pesar de que uno de ellos no se encuentra más en mi vida continua dándome lecciones para seguir mejorando

AGRADECIMIENTO

A mi asesora Dra. Marianela Cobos Ruiz, por su dedicación e infinita paciencia en el proceso de planteamientos, ejecución y procesamiento de datos de la presente tesis, además de su comprensión y apoyo ante los imprevistos en el enfoque de la tesis y en las decisiones tomadas durante el transcurso del trabajo.

Al Dr. Juan Carlos Castro Docente investigador de la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales (CIRNA) por brindarme su conocimientos y la constante motivación para la realización del trabajo de investigación.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Biotecnología y bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP). Por el compañerismo y colaboración incondicional que me prestaron durante el planteamiento, practica y ejecución de mi tesis.

A toda mi familia, compañeros y profesores, quienes me brindaron su apoyo, gracias a ese apoyo, constante motivación y fe puesta en mí y mis capacidades durante todos estos años, he logrado desarrollarme como persona y profesional.

A la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonia - CIRNA, en la persona del Dr. Jorge Luis Marapara Del Águila, por permitirme el acceso a las instalaciones e instrumentos y equipos para llevar a cabo la parte experimental de extracción de lípidos totales de la presente tesis.

A todo el equipo de trabajo de la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRNA) de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP), que colaboraron desinteresadamente en la realización de mi tesis brindando todo su apoyo, durante el proceso.

¡Gracias totales!

JURADO CALIFICADOR



Ing. Ulises Octavio Irigoin Cabrera MSc.
PRESIDENTE



Dr. Jorge Luis Marabara del Águila
MIEMBRO



Ing. Carmen Patricia Cerdeña del Águila, Mgr
MIEMBRO



Dra. Marianela Cobos Ruíz
ASESORA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Iquitos, a las 19:00 horas del día lunes 21 de setiembre del año 2015, se reunió el Jurado Examinador, que firma al final del presente documento, para evaluar la Sustentación de la bachiller en Ecología:

MARÍA ZADITH CASUSO WONG

En la modalidad de: **SUSTENTACIÓN DE TESIS**
"Efecto de diferentes tiempos de exposición de CO₂ en la producción de biomasa y acumulación de lípidos totales de cuatro especies de microalgas amazónicas"

Después de las deliberaciones correspondientes, se procedió a evaluar:

Indicador	Examinador 1	Examinador 2	Examinador 3	Promedio
A) Dominio del Tema	18	17	17	17
B) Calidad de Redacción de la Tesis	17	17	16	17
C) Competencia Expositiva (Claridad conceptual, argumentación y coherencia)	17	17	17	17
D) Calidad de Respuestas	17	17	17	17
E) Uso de Terminología Especializada	17	17	16	17
Calificación Final:				17

Aprobado Por: Unanimidad

Calificación Final (en letras): Diecisiete

Presidente: Ing. Ulises Octavio Irigoín Cabrera M.Sc.

Miembro: Ing. Carmen Patricia Cerdeña Del Águila Mgr.

Miembro: Dr. Jorge Marapara Del Águila

INDICADOR	PUNTAJE
Desaprobado	Menos de 13 puntos
Aprobado por Mayoría	De 14 a 15 puntos
Aprobado por Unanimidad	De 16 a 17 puntos
Aprobado por Excelencia	De 18 a puntos

La Universidad Vira en Ti

Av. Abelardo Quiñones Km. 2,5 San Juan Bautista, Iquitos Telf.:(065) 261088-261092

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTO	3
JURADO CALIFICADOR	4
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS	5
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	10
RESUMEN	11
CAPÍTULO I	13
Introducción	13
CAPÍTULO II	15
OBJETIVOS	15
CAPÍTULO III	16
MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL	16
3.1. Marco teórico	16
3.1.2 Generalidades de las microalgas.	16
3.1.2 Clasificación de las microalgas.	17
3.1.1.1. Cyanophyta	17
3.1.1.2. Chlorophyta	17
3.1.1.3. Cryptophyta.	17
3.1.1.4. Chrysophyta.	17
3.1.1.5. Pyrrophyta.	18
3.1.1.6. Euglenophyta.	18
3.1.2. Microalgas oleaginosas.	18
3.1.3. Crecimiento microalgal.	19
3.1.3.1. Curva de Crecimiento Microalgal	19
3.1.3.1.1. Fase de adaptación	19
3.1.3.1.2. Fase Exponencial	19
3.1.3.1.3. Fase de Declinación Relativa del Crecimiento	19
3.1.3.1.4. Fase Estacionaria	20
3.1.3.1.5. Fase de Muerte	20
3.1.4. Microalgas y cambios globales (23)	21

3.1.5. Biomasa	22
3.1.5.1. Usos energéticos de la biomasa	22
3.1.6. Lípidos	23
3.1.6.1. Clasificación de los lípidos	23
3.1.6.1.1. lípidos simples	23
3.1.6.1.2. Lípidos compuestos	23
3.1.6.1.3. Compuestos asociados	23
3.1.6.2. Biosíntesis de lípidos en microalgas	24
3.1.6.3. Biosíntesis de ácidos grasos.	25
3.1.6.4. Biosíntesis de triglicéridos.	27
3.1.7. Dióxido de Carbono	28
3.1.7.1. Problemática del aumento del CO ₂ atmosférico	28
3.1.7.2. Importancia del CO ₂	29
3.1.7.3. Fuente de carbono	29
3.2. Definición de términos básicos.	30
3.3. Antecedentes	32
CAPÍTULO IV	34
MATERIALES Y MÉTODOS	34
4.1. Lugar y desarrollo de la investigación.	34
4.2. Recursos utilizados.	34
4.2.1. Materiales.	34
4.2.2. Equipos.	35
4.2.3. Reactivos.	35
4.2.4. Programas.	36
4.3. Diseño de la investigación	36
4.4. Población y muestra.	37
4.4.1. Población.	37
4.4.2. Muestra.	37
4.5. Técnicas, Instrumentos y procedimientos de recolección de datos.	38
4.5.1. Técnica de recolección de datos:	38
4.5.2. Instrumento de recolección de datos:	38

4.5.3. Procedimiento Experimental.	38
4.5.3.1. Cultivo y cosecha microalgal.	38
4.5.3.2. Evaluación de los bioensayos con diferentes tiempos de exposición de CO ₂	39
4.5.3.3. Cosecha de la Biomasa microalgal.	39
4.5.3.4. Extracción y análisis de lípidos totales.	39
4.6. Análisis de datos.	40
CAPÍTULO V	41
RESULTADOS	41
5.1. Tasa de crecimiento (μ) de dos especies microalgales oleaginosas sometidas a diferentes tiempos de exposición al CO ₂	41
1.2. Perfil de crecimiento de cuatro especies microalgales oleaginosas sometidas a diferentes tiempos de exposición al CO ₂	41
1.3. Producción de biomasa y contenido de lípidos totales en cuatro especies microalgales oleaginosas sometidas a diferentes tiempos de exposición al CO ₂	45
CAPÍTULO VI	49
DISCUSIÓN	49
CAPÍTULO VII	52
CONCLUSIONES	52
CAPÍTULO VIII	53
RECOMENDACIONES	53
CAPÍTULO IX	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXOS	58

ÍNDICE DE TABLAS

N°	Título	Pág.
01	Valores promedio de la tasa de crecimiento (μ) de cuatro especies microalgales oleaginosas sometidas a diferentes tiempos de exposición al CO ₂	41
02	Biomasa en peso seco (mg/L) de cuatro especie de microalgas oleaginosas cultivadas en diferentes tiempos de exposición al CO ₂	46
03	Contenido de lípidos totales (%) de cuatro especies de microalgas oleaginosas cultivadas en diferentes tiempos de exposición al CO ₂	46
04	Comparaciones entre las variables de biomasa mediante la prueba estadística ANOVA.	58
05	Comparaciones entre las variables de lípidos mediante la prueba estadística ANOVA	59
06	Comparaciones entre las variables de biomasa mediante la prueba de post hoc	60
07	Comparaciones entre las variables de lípidos mediante la prueba de post hoc	61
08	Composición del medio CHU10	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Título	Pág.
01.	Curva representativa de crecimiento de un cultivo estático de microalgas (Modificado por Fogg y Thake 1987). 1- Fase de adaptación; 2- Fase de crecimiento exponencial; 3- Fase de declinación relativa de crecimiento; 4- Fase estacionaria; 5- Fase de muerte	20
02.	Síntesis de ácidos grasos en el cloroplasto	25
03.	Esquema simplificado de la ruta de biosíntesis de triglicéridos en microalgas.	27
04.	Flujograma de inducción de lípidos en cinco especies de microalgas amazónicas sometidas a diferentes tiempos de exposición al CO ₂	37
05.	Curva de crecimiento de <i>Scenedesmus.sp</i> sometida a diferentes tiempos de exposición al CO ₂	42
06.	Curva de crecimiento de <i>Scenedesmus quadricauda</i> sometida a diferentes tiempos de exposición al CO ₂	43
07.	Curva de crecimiento de <i>Ankistrodesmus nannoselene</i> sometida a diferentes tiempos de exposición al CO ₂	44
08.	Curva de crecimiento de <i>Chlorella sp</i> sometida a diferentes tiempos de exposición al CO ₂	45
09.	Contenido de Biomasa en peso seco (mg/L) de cuatro especie de microalgas oleaginosas cultivadas en diferentes tiempos de exposición al CO ₂	47
10.	Contenido de lípidos totales (%) de cuatro especies de microalgas oleaginosas cultivadas en diferentes tiempos de exposición al CO ₂	48
11.	Cultivos iniciales de las cuatro especies de microalgas amazónicas	64
12.	Cosecha microalgal para ensayos	65
13.	Ensayos de cuatro especies de microalgas amazónicas sometidas a diferentes tiempos de exposición al CO ₂ .	65
14.	Cosecha de las microalgas sometidas a tratamiento. (Secado, raspado y pesado)	66
15.	Extracción de lípidos totales de las cuatro especies microalgales sometidas a diferentes tiempos de exposición de CO ₂	67

RESUMEN

Con la disminución de las reservas petroleras y la contaminación causada por el aumento de CO₂ atmosférico(1), es de suma importancia buscar alternativas de abastecimiento energético y disminución de emisiones de CO₂, siendo una de estas el uso de microalgas oleaginosas, debido a que su mayor elemento nutritivo es el carbono, el cual convierten en biomasa, favoreciendo además la producción del contenido de triglicéridos(2). Variando cuando son sometidas a condiciones estresantes (salinidad, concentración de CO₂ y deficiencia de nitrógeno)(3). Por tanto, se realizó esta investigación para evaluar el efecto de diferentes tiempos de exposición de CO₂ en la producción de biomasa y acumulación de lípidos totales en cuatro especies de microalgas amazónicas. Las especies *Scenedesmus sp.*, *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella sp.* y *Ankistrodesmus nannosele* se cultivaron por triplicado en medio CHU, sometidas a 4, 6 y 8 minutos de exposición al CO₂ más un control. Con aireación constante, a 26°C, fotoperiodo de 12h:12h luz/oscuridad e intensidad lumínica de 100 $\mu\text{E. m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ por siete días. Luego, fueron cosechadas por centrifugación y secadas a 50°C por 72 horas. De 50 mg de biomasa seca se extrajeron los lípidos totales con cloroformo: metanol (2:1) y el contenido se determinó por gravimetría. Se pudo determinar que la mayor tasa de crecimiento fue con *Chlorella sp.* (0.18 Dia^{-1}) en el control. Sin embargo, *Scenedesmus sp.* obtuvo la mayor producción de biomasa a los 8 minutos de exposición (901.63mg/L), encontrándose diferencias significativas entre las cuatro especies ($F = 13,81$; $gl = 11$; $p = <0,05$). En la producción de lípidos totales (%) *Chlorella sp.* Presento el mayor porcentaje de lípidos con 47.60% al minuto seis de exposición, no encontrándose diferencia significativa entre la producción de lípidos totales en las especies evaluadas ($F=5,06$; $gl=11$; $p=>0,05$). Concluyendo que el tiempo de exposición al CO₂ indujo la producción de biomasa microalgal de manera significativa. Igualmente, estos tratamientos indujeron la acumulación de lípidos totales en las cuatro especies pero no de manera significativa.

Palabras claves: efecto, microalgas amazónicas, dióxido de carbono, lípidos totales.

ABSTRACT

With the decrease of oil reserves and pollution caused by the increase of atmospheric CO₂ (1), it is important to seek an alternative energy supply and CO₂ emission reduction, one of these it's microalgae oil use, because its higher nutritional element is carbon, which is converted into biomass, favoring the production of triglyceride content (2). Varying under stressful conditions (salinity, CO₂ concentration and nitrogen deficiency) (3). Therefore, this research was conducted to evaluate the effect of different CO₂ exposure times in biomass production and total lipid accumulation in four Amazonian microalgae species. *Scenedesmus* sp. *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella* sp. and *Ankistrodesmus nanoselene* were cultured in triplicate using CHU culture medium, under 4, 6 and 8 minutes of CO₂ exposure and a control group. With constant aeration, at 26 ° C, photoperiod of 12h: 12h light/dark and a light intensity of 100 μE. m². s⁻¹ for seven days. Then, they were harvested by centrifugation and dried at 50 ° C for 72 hours. total lipids were extracted of 50 mg of dry biomass with chloroform : Methanol (2: 1) and the content was determined gravimetrically It was determined that the highest rate of growth was with *Chlorella* sp (0.18 Dia-1) in the control group. However, *Scenedesmus* sp. had the highest biomass production at 8 minutes of exposure (901.63mg / L), significant differences between the four species were found (F = 13.81, df = 11, p = <0.05). On total lipids production (%) *Chlorella* sp. Had the highest percentage of lipids with 47.60% at six minute exposure, no significant difference was found between total lipid production in the evaluated species (F = 5.06, df = 11, p => 0.05). Concluding that the exposure time to CO₂ induced significantly the production of microalgal biomass. As well, these treatments induced total lipid accumulation in the four species but not significantly.

Keywords: effect, Amazon microalgae, carbon dioxide, total lipids.

CAPÍTULO I

Introducción

En la actualidad nuestro planeta está afrontando dos grandes problemas, la disminución de las reservas petroleras y la contaminación causada por la quema de los combustibles fósiles, causando un aumento del CO₂ atmosférico y provocando el calentamiento global. Consecuentemente, el CO₂ atmosférico ha experimentado un aumento de 375 [345 a 405] Giga toneladas de carbono (GtC) entre los años 1750 al 2011, procedentes de la combustión de combustibles fósiles, de tal modo que es uno de los contaminantes más abundantes de la atmósfera(4)

Por tanto, es necesario implementar estrategias para disminuir la concentración del CO₂ atmosférico y una de las alternativas promisorias es el uso de microalgas oleaginosas, debido a que el mayor elemento nutritivo de estas microalgas es el carbono, que absorben espontáneamente del aire bajo la forma de CO₂ convirtiéndolo en biomasa. Estos son microorganismos unicelulares fotosintéticos que se encuentran en diversos ambientes como el agua salada, agua dulce y suelo, asimismo son responsables del material orgánico presente en los ecosistemas acuáticos generados por el proceso fotosintético. Se estima que la eficiencia fotosintética de las microalgas es mayor que el de las plantas terrestres fijando de 10 a 50 veces más CO₂ (5) y son responsables del 40% de la fotosíntesis del planeta. Por tanto, las microalgas consumen la mayor cantidad de dióxido de carbono (CO₂) generado en la tierra.

El consumo de CO₂ atmosférico por las microalgas oleaginosas favorece también la producción de biocombustibles, específicamente biodiesel, debido a su eficiencia fotosintética, son más eficaces en la asimilación de CO₂ y otros nutrientes con respecto a las plantas y acumulan entre 20 y 80% de triglicéridos (2). Este biocombustible es una de las principales alternativas que se han encontrado para mitigar y combatir los daños causados por el uso excesivo de los combustibles fósiles, los cuales han venido generando una gran contaminación al emplearse en actividades como las del sector transporte, comercial e industrial.

Por lo que, satisfacer la demanda energética generada por estas actividades del sector transporte, comercial e industrial, requeriría de grandes áreas de cultivo para producir una mayor cantidad de plantas oleaginosas tales como el maíz, girasol, soja, coco, palma, jatropha, colza o canola (6). Además para reemplazar todo el combustible de transporte consumido solo en los Estados Unidos con biodiesel son necesarios 0.53 mil millones m³ de biodiesel anual; por lo que la producción normal que se genera de los cultivos de plantas oleaginosas no alcanzarían para satisfacer esta demanda. Pero si se pudiera llegara a implementar el uso de microalgas para producir biodiesel, entre 1 y 3 % del total de

área de cultivo de los EE.UU, serían suficientes para producir la biomasa que satisfaga el 50 % del combustible que necesita el sector transporte (7). Durante muchas décadas los combustibles fósiles han sido la principal fuente energética y principal motor de la economía mundial, sin embargo, no se han descubierto nuevos yacimientos petroleros de gran importancia o impacto en la producción mundial, además de que su utilización, genera grandes emisiones de CO₂ a la atmosfera causando serios problemas ambientales. (8)

Actualmente, las microalgas representan la alternativa con mayor viabilidad para la producción de biocombustibles por el hecho que sintetizan 30 veces más aceite por hectárea que las plantas terrestres usadas para la fabricación de biodiesel (9). Aunado a eso, el cultivo de biomasa microalgal aparte de proveer materia prima de biocombustibles, tiene un impacto ambiental favorable al reducir la concentración de gases de efecto invernadero, debido a que utiliza grandes cantidades de CO₂ durante su cultivo(10).

Estos microorganismos fotosintéticos usan el carbón inorgánico para su crecimiento y por ende pueden convertir el CO₂ de una fuente puntual a biomasa. Las microalgas comparadas con otros cultivos, tienen una mayor eficiencia fotosintética, mayor producción de biomasa y un crecimiento más rápido (11–13). Ante esto, las microalgas presentan la ventaja de que el contenido lipídico puede ser controlado y manipulados en función de las condiciones de cultivo, principalmente mediante la limitación de algunos nutrientes(3).

En la aplicación de microalgas para la remoción de dióxido de Carbono y la producción de energía, la tolerancia al CO₂, biomasa y contenido de ácido graso son de gran importancia. Las microalgas con tolerancia a mayor concentración de CO₂, con mayor rapidez en su crecimiento y mayor contenido de ácidos grasos favorables para una buena calidad para la producción de biodiesel tendrían un gran potencial para la aplicación en producciones industriales. Teniendo en cuenta que la acumulación de lípidos (triglicéridos) pueden ser transformados en biodiesel(12).

En este sentido, en la presente investigación se pretende evaluar el efecto de los diferentes tiempos de exposición al CO₂ en la producción de biomasa y acumulación de lípidos totales de cuatro especies de microalgas amazónicas (*Ankistrodesmus nannoselene*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Scenedesmus quadricauda*), con la finalidad de conocer el comportamiento de estas especies oleaginosas para contribuir y proporcionar conocimientos básicos sobre el consumo de CO₂ por las microalgas y la disminución de la emisión en el ambiente.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

1.1 General

- Evaluar el efecto de diferentes tiempos de exposición de CO₂ en la producción de biomasa y acumulación de lípidos totales en *Ankistrodesmus nannoselene.*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Scenedesmus quadricauda.*

1.2 Específicos

- Determinar la tasa de crecimiento de *Ankistrodesmus nannoselene.*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Scenedesmus quadricauda* en respuesta a diferentes tiempos de exposición de CO₂.
- Precisar la concentración de biomasa microalgal de *Ankistrodesmus nannoselene.*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Scenedesmus quadricauda* en los diferentes tiempos de exposición de CO₂.
- Analizar el porcentaje de lípidos totales en *Ankistrodesmus nannoselene.*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Scenedesmus quadricauda* en respuesta a diferentes tiempos de exposición de CO₂.

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

3.1. Marco teórico

3.1.2 Generalidades de las microalgas.

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariontes (cianobacterias) y eucariontes, que se localizan en hábitats diversos como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo. Los grupos que las conforman presentan individuos con notables similitudes morfológicas, pero versátiles en términos de tamaño, forma y función ecológica las cuales surgen como respuestas adaptativas convergentes a medio físico en el que habitan tales como el rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes (14) se les considera responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta.(15)

Su biodiversidad es enorme, se han identificado alrededor de 40,000 especies aunque se estima que existen más de 100,000 de muchas de ellas se desconoce su composición bioquímica y metabolismo. Las microalgas se clasifican de acuerdo a varios parámetros: pigmentación, ciclo de vida, morfología y estructura celular; solo las formas más pequeñas tienden a ser redondeadas; las medianas y las grandes muestran algún grado de alargamiento o poseen apéndices, prolongaciones, cuernos, espinas y otras estructuras que aumentan tanto la fricción con el agua como la relación superficie/volumen para la absorción de nutrientes. Las especies más estudiadas para aplicaciones biotecnológicas corresponden a las algas verdes y a las diatomeas (7,16,17).

Los ciclos de vida son cortos e incluyen la formación de esporas de resistencia o de células de reposo, con lo cual sobreviven en situaciones desfavorables, su nutrición es por absorción iónica de Carbono (C), Hidrógeno (H), Oxígeno (O), Nitrógeno (N), Fósforo (P), Azufre (S), Potasio (K), Calcio (Ca), Hierro (Fe), Magnesio (Mg), así como de cantidades traza de Manganeso (Mn), Boro (B), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Zinc (Zn) y Molibdeno (Mo); si bien, para algunas especies son necesarias otras moléculas inorgánicas y orgánicas complejas. De los grupos que las conforman, las cianofitas, clorofitas, crisófitas, euglenofitas y diatomeas pennales son más comunes en las aguas dulces.

3.1.2 Clasificación de las microalgas.

Los primeros intentos por clasificar los grupos de microalgas se basaron en la pigmentación, cuya importancia todavía no se reconoce cuando se hablan de los distintos grupos de microalgas. Hoy en día, se consideran también las siguientes características importantes para definir los principales grupos de microalgas: morfología (presencia o ausencia de flagelos), características del flagelo (numero, longitud, punto de intersección, presencia o ausencia de pelos o escamas), composición de la pared celular y tipos de productos fotosintéticos almacenado. Hasta hoy en día, existen muchas variables que son temas de discusión para la clasificación de las microalgas; se dice que existen casi tantos esquemas de clasificación como autores sobre el tema. Las clases son agrupadas de acuerdo al esquema de Canell (18). Las microalgas se dividen en los siguientes grupos:

3.1.1.1. Cyanophyta

Conocidas comúnmente como algas verde azuladas. Al igual que las bacterias, son organismos procariotas, cuyas células no presentan sistemas de membranas internas que aislen los organelos del citoplasma.

3.1.1.2. Chlorophyta

Son las conocidas como algas verdes, con cloroplastos de este color muy bien definidos, con formas y localizaciones celulares diferentes.

3.1.1.3. Cryptophyta.

Las células son a menudo unicelulares y flageladas, con plastos generalmente de color marrón, aunque los hay verdes, amarillos o verde azulados. Las células presentan una forma particular, con frecuencia aplanada, y dos flagelos casi iguales.

3.1.1.4. Chrysophyta.

Individuos unicelulares o coloniales, raramente filamentosos. Presentan plastos de color amarillo o marrón, a menudo verdosos, por lo que se conocen vulgarmente como algas de color dorado. Existen multitud de formas diversas. Las células se encuentran impregnadas en sílice formando valvas que suelen situarse a modo de caja, y que pueden presentar una ornamentación característica de cada especie.

3.1.1.5. Pyrrophyta.

En general son células flageladas móviles, aunque hay especies cocoides inmóviles. Las células suelen presentar una hendidura ecuatorial en la que se insertan dos flagelos, uno transversal y otro longitudinalmente.

3.1.1.6. Euglenophyta.

Incluye todas las formas unicelulares, solitarias, desnudas o loricadas (cubierta formada por escamas), que nadan libremente, provistas de 1, 2, 3 ó 7 flagelos dispuestos de forma variada.

3.1.2. Microalgas oleaginosas.

Son microalgas que poseen ácidos grasos como componentes de su membrana, productos de almacenamiento, metabolitos y fuente de energía (19). Es por ello que estos microorganismos representan una opción como materia prima para producir biodiesel, debido a la mayor productividad de biomasa y mayor velocidad de replicación con respecto a plantas cultivables (3), algunas especies de microalgas pueden acumular entre 20-80% (peso seco) de triglicéridos (2), y no requieren terrenos cultivables para el crecimiento celular no compitiendo por alimento humano (20).

Para la producción exitosa de biodiesel empleando microalgas como sistemas biológicos para la acumulación de biomasa y lípidos, el primer punto crítico es buscar e identificar cepas híper productoras de lípidos(21). A pesar de que el intervalo de lípidos contenidos en microalgas oscila entre 1-75% (peso seco), algunas especies pueden alcanzar hasta el 90% (peso seco) bajo condiciones específicas de cultivo(3).

Para elegir una cepa se debe considerar una estrategia de selección en base a diversos criterios que sean prácticos a los siguientes problemas: a) velocidad de crecimiento, cuantificado normalmente por biomasa total acumulada por unidad de tiempo y unidad de volumen; b) cantidad y calidad lipídica; c) respuesta a alteraciones del ambiente, se consideran variaciones de temperatura, entrada de nutrientes y fuente lumínica, así como competencia con otras especies de microalgas o bacterianas; d) velocidad de absorción y afinidad por nutrientes, particularmente CO₂, nitrógeno y fósforo; e) cultivo de biomasa sencillo para su posterior procesamiento (22).

3.1.3. Crecimiento microalgal.

El crecimiento microalgal es un proceso autocatalítico de incremento en la cantidad de materia autoduplicante y donde la reacción catalizada (crecimiento) resulta en la producción de más y más catalizadores (materia viviente).

Bajo condiciones de "crecimiento balanceado", la duplicación de la biomasa está acompañada con la duplicación de todas las otras propiedades medibles de la población, por ejemplo, niveles de proteína, ARN, ADN, clorofila y agua intracelular, es decir mantienen una composición química constante; y es suficiente medir algún componente bioquímico para determinar la tasa de crecimiento algal.

3.1.3.1. Curva de Crecimiento Microalgal

En condiciones ideales de cultivo, las microalgas presentan cinco fases de crecimiento, las cuales se suscitan progresivamente en el cultivo.

3.1.3.1.1. Fase de adaptación

En donde no ocurre incremento en el número de células pudiendo incluso llegar a disminuir en número con respecto al inóculo inicial Exponencial Ya una vez adaptadas al medio de cultivo las microalgas comienzan a multiplicarse puesto que la división da lugar a nuevas células que son capaces de dividirse el aumento en número de microalgas se acelera continuamente en forma exponencial.

3.1.3.1.2. Fase Exponencial

Al adaptarse las células al medio, la velocidad de multiplicación se caracteriza por tener una forma geométrica. Esta fase es la más importante, porque indica que el cultivo debe cosecharse, transferirse o diluirse debido al incremento máximo en la densidad celular. La fase exponencial puede presentarse del segundo al tercer día después de inoculado el medio y prolongarse hasta cuatro días. Si se controla la tasa de dilución del cultivo, esta etapa puede prolongarse por varias semanas.

3.1.3.1.3. Fase de Declinación Relativa del Crecimiento

En esta fase, que puede durar de uno a dos días, empieza a manifestarse la muerte de las células debido a condiciones desfavorables en el cultivo generadas en la fase anterior (agotamiento de nutrientes, aumento de metabolitos de desecho, cambios de pH) y consecuentemente empieza a disminuir la densidad celular.

3.1.3.1.4. Fase Estacionaria

En este periodo, el número de microalgas permanece constante. En ocasiones el fenómeno apenas se detecta y puede presentarse en su lugar la fase de muerte.

3.1.3.1.5. Fase de Muerte

Al incrementarse el número de células muertas y las condiciones desfavorables, tales como el aumento del número de bacterias, hongos, metabolitos de desecho y espuma, producto de la destrucción celular, generan el colapso final del cultivo.

La duración de cada fase de cultivo puede acortarse, alargarse o apenas reconocerse dependiendo de diversos factores como: temperatura, fuente de luz, composición nutricional del medio de cultivo, tamaño del inóculo y estado fisiológico del alga. En la práctica, la fase de adaptación no es tan marcada en los cultivos microalgales, sino más bien parece ocurrir una fase de multiplicación de las células algales. Esto se debe a que los medios frescos casi siempre se inoculan con cultivos algales en fase cercanamente estacionaria, por lo que hay crecimiento de células jóvenes “viables” y por consiguiente una multiplicación de células desde el inicio de los cultivos microalgales. Con la finalidad de observar adecuadamente la fase log, se tendría que determinar la “edad” más apropiada del inóculo y/o también realizar cultivos sincrónicos, donde todas células mantienen el mismo patrón de desarrollo del ciclo celular.

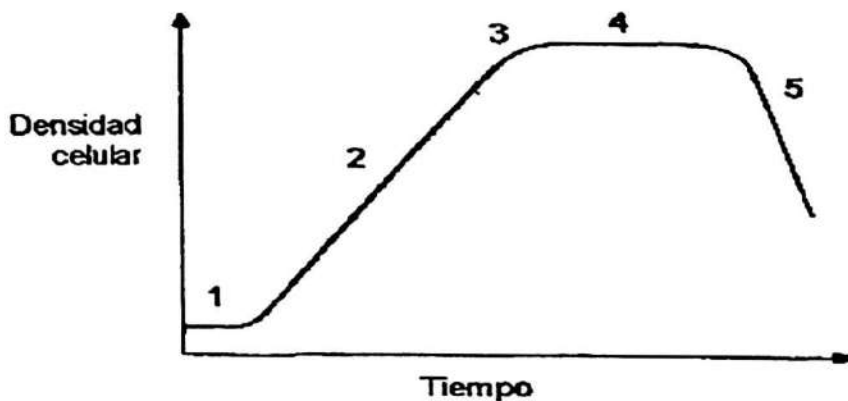


Figura 01. Curva representativa de crecimiento de un cultivo estático de microalgas (Modificado por Fogg y Thake 1987).
1- Fase de adaptación; 2- Fase de crecimiento exponencial; 3- Fase de declinación relativa de crecimiento; 4- Fase estacionaria; 5- Fase de muerte.

3.1.4. Microalgas y cambios globales (23)

Hay muchas evidencias que aseguran que el pigmento clorofila y su función de convertir la energía luminosa en energía química mediante el proceso de fotosíntesis, iniciaron la evolución biológica en los océanos desde varios miles de años. Son más de 1000 millones de toneladas de clorofila que se producen y acumulan anualmente en la tierra y el océano. Esto se puede corroborar si tomamos en cuenta el corto tiempo de generación del fitoplancton es comúnmente reconocido como la base de toda la producción animal en el ambiente marino, y consecuentemente, se convierte en el eslabón trófico que soporta a la mayoría de las actividades pesqueras del mundo. Esto conlleva a que se realicen periódicamente estudios bioecológicos y de seguimiento de estas poblaciones microscópicas, puesto que cualquier desbalance en su abundancia puede constituirse en un agente de alto impacto en el cambio global del planeta. En un sentido amplio, se deben generar proyectos dirigidos al monitoreo ambiental del fitoplancton y de la contaminación y prevención de los problemas ambientales planteados.

Debemos mencionar también que el fitoplancton puede influenciar en el balance químico global y en los cambios climáticos del mundo. Los mecanismos de acción de mayor importancia son:

- El fitoplancton utiliza el dióxido de carbono en la fotosíntesis y por consiguiente puede afectar el balance global de esta molécula.
- El fitoplancton contribuye al calentamiento estacional de las capas superficiales del océano debido a la absorción de la radiación solar durante la fotosíntesis.

El carbono orgánico producido mediante la fotosíntesis del fitoplancton, conocido como producción primaria, es consumido, oxidado y regenerado como CO_2 y circula a través de las cadenas tróficas. Aproximadamente 90% de esta regeneración ocurre en la zona trófica de los mares y océanos.

La intensidad y la diversificación de muchas industrias y de los sistemas de transporte en el mundo, obligan a un incremento cada vez mayor en el consumo de combustibles fósiles, y por consiguiente a un aumento en la emisión de CO_2 en la atmósfera. La comunidad industrial perteneciente a la asociación internacional del cambio climático ha conminado a todos los países del mundo a disminuir las tasas de emisión de los gases de efecto invernadero, con la finalidad de evitar un número considerable de desastres climáticos, generalmente que afectan a la gente más pobre. En este sentido se necesitan tecnologías innovadoras e inteligentes para balancear el incremento en la emisión de CO_2 y buscando en todo momento la protección ambiental.

Los gobernantes y compañías del mundo han dirigido su interés en la fijación de CO₂ mediante procedimientos biotecnológicos. Las microalgas en un futuro cercano podrían convertirse en un componente importante en la producción global de energías renovables y un agente de abatimiento del gas invernadero del mundo.

3.1.5. Biomasa

Según la Unión Europea se entiende por biomasa a la fracción biodegradable de productos, desechos y residuos de la agricultura (incluyendo sustancias vegetales y animales), silvicultura e industrias relacionadas, así como la fracción biodegradable de los residuos municipales e industriales.

Tipos de biomasa: (24)

- **Biomasa natural:** Se produce de forma espontánea en la naturaleza, sin intervención humana (podas naturales de los bosques).
- **Biomasa residual seca:** Procede de recursos generados de las actividades agrícolas, forestales, industrias agroalimentaria y maderera (aserrín).
- **Biomasa residual húmeda:** Procede de vertidos biodegradables formados por aguas residuales urbanas e industriales y residuos ganaderos.

3.1.5.1. Usos energéticos de la biomasa

La tecnología aplicada a la biomasa está teniendo un gran desarrollo y se concentra en incrementar el rendimiento energético y la productividad de este recurso. La utilización de la biomasa como fuente de energía puede contribuir a sustituir la utilización de los combustibles fósiles, lo que daría mayor seguridad energética nacional con una diversificación más amplia de las fuentes de energía (25).

- Sólido: Leña y bagazo.
- Líquido: Alcoholes (etanol y metanol) y Biodiesel.
- Gaseoso: Biogás y materia sólida gasificada.

3.1.6. Lípidos

Grupo de compuestos constituidos por carbono, hidrogeno y oxígeno, que integran cadenas alifáticas o aromáticas, en ocasiones también contienen fosforo y nitrógeno. Debido al gran número de sustancias consideradas como lípidos, se les clasifica en tres grupos de acuerdo a su estructura química (25)

3.1.6.1. Clasificación de los lípidos

3.1.6.1.1. lípidos simples

Son ester de ácidos grasos y alcoholes, a) Grasas y aceites: éteres de glicerol y alcoholes con ácidos monocarboxílicos. b) Ceras: ester de alcoholes monohidroxilados y ácidos grasos.

3.1.6.1.2. Lípidos compuestos

Son lípidos simples conjugados con moléculas no lipídicas. a) Fosfolípidos: Esteres que contienen ácidos fosfóricos en lugar de un ácido graso, combinado con una base de nitrógeno. b) Glucolípidos: Compuestos de carbohidrato, ácidos grasos y esfingosinol, llamados también cerebrosidos. c) Lipoproteínas: Compuestos de lípidos y proteínas.

3.1.6.1.3. Compuestos asociados

En esta clasificación se consideran a los ácidos grasos (derivados de lípidos simples), pigmentos, vitaminas liposolubles, esteroides (entre los esteroides más destacados se encuentran las hormonas sexuales, las corticoides y el colesterol) e hidrocarburos.

Las grasas y los aceites son los lípidos más abundantes e importantes para la aplicación industrial. Químicamente son mezclas de triglicéridos, con cantidades menores de otros lípidos. Los triglicéridos están constituidos por una molécula de glicerol (alcohol) a la cual se encuentran unidos tres ácidos grasos (26).

Los ácidos grasos son cadenas hidrocarbonadas lineales con un grupo metil (CH_3) y un grupo carboxilo al final (27). Existe un amplio espectro de ácidos grasos de diferentes longitudes de cadenas de carbonos. Estos ácidos grasos también pueden presentar dobles enlaces, si solo presentan un enlace dentro de la estructura, se denomina ácidos grasos monoinsaturados, si hay dos o más dobles enlaces poliinsaturados y si por el contrario la cadena no presenta dobles enlaces, son designados saturados (28). Los ácidos grasos poliinsaturados, se clasifican en n-6(ω -6) y n-3 (ω -3) según la posición del

doble enlace con respecto al medio terminal de la molécula. El principal ácido graso n-6 es el ácido linolèico (18:2 ω -6), presente en los aceites vegetales de maíz, girasol y soya. El ácido γ -linolèico (18:3 ω -3) predomina en las plantas; y aquellos ácidos grasos n-3 de cadena más larga, como el eicosapentanoico (EPA, 20:5 ω -3) y el decosahecanoico (DHA, 22:6 ω -3) abundan en los pescados, mariscos y aceites marinos (25).

Los principales componentes de la fracción lipídica en las microalgas son los triglicéridos o triacilgliceroles, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glucolípidos (predominantes en membranas de los cloroplastos), fosfolípidos (abundantes en plasmalema y diversos sistemas endomembranosos), aunque pueden presentarse compuestos inusuales tales como ácidos grasos halogenados e hidroxilados, entre otros (29).

3.1.6.2. Biosíntesis de lípidos en microalgas

Los efectos en los cultivos microalgales dependientes de la luz son de gran relevancia, ya que están relacionados directamente con el proceso de fotosíntesis (30). En microalgas verdes, la ruta metabólica para la síntesis de ácidos grasos empieza por la unión del complejo luz-biomasa, el cual está mediado por la clorofila II y carotenoides, los cuales capturan la energía lumínica en forma de fotones. La energía es empleada por el fotosistema II en la oxidación catalítica del agua, formando protones, electrones y O₂ molecular. Los electrones se transportan mediante la cadena de transporte fotosintética para promover la producción de NADPH mediante la reducción de ferredoxina. Dentro del lumen tilacoidal se genera un gradiente electroquímico, debido a la liberación de protones después de la oxidación de agua; el cual se emplea para la formación de ATP mediante la vía ATP sintasa. Los productos de la fotosíntesis NADPH y ATP son sustratos del ciclo de Calvin (31); donde la enzima Rubisco cataliza la conversión de CO₂ y ribulosa-5-fosfato en dos triosas, las cuales son convertidas subsecuentemente en piruvato y acetyl-CoA (32).

Las moléculas de acetyl-CoA son carboxiladas dentro del cloroplasto por acetyl-CoA carboxilasa (ACC) para la síntesis de malonil-CoA (17), molécula que es transferida a la proteína transportadora de grupos acil (ACP) del complejo multi-enzimático sintasa de ácidos grasos (SAG); donde la subunidad cetoacil-ACP sintasa (CAS) cataliza la condensación de malonil-ACP mediante tres reacciones cíclicas: reducción, deshidratación y reducción; condensando el producto con otra molécula de malonil-CoA (30). El ciclo se repite hasta formar cadenas saturadas de ácido palmítico (16:0) o esteárico (18:0). La enzima ACP-sintasa abre la cadena acil y libera el ácido graso (33).

La formación de triacilgliceroles se lleva a cabo en el retículo endoplasmático, en organelos especializados llamados plástidos, donde se producen lípidos neutros con la finalidad de almacenar energía y liberar espacio dentro de la célula (34). La primera reacción para la síntesis de triacilgliceroles (TAG) es la condensación (acilación) de glicerol-3-fosfato (G3P) con acil-CoA para formar lisofosfátido (LPA), el cual es catalizado por acil-CoA: glicerol-sn-3-fosfato acil-transferasa (GPAT) y otra molécula de acil-CoA para producir fosfatidato (PA) (33). Posteriormente, PA puede ser desfosforilado por la enzima ácido fosfatídico fosfatasa (PAP) para formar diacilglicerol. Finalmente, la síntesis de TAG es catalizada por acil-CoA: diacilglicerolacil-transferasa (DGAT), la cual incorpora un tercer grupo acil-CoA a la molécula diacilglicerol, los TAGs resultantes son almacenados en cuerpos de aceites (35), los cuales son la materia prima para obtener biodiesel.

3.1.6.3. Biosíntesis de ácidos grasos.

En las microalgas la síntesis de nuevos ácidos grasos ocurre principalmente en el cloroplasto (figura 02). La ruta metabólica produce ácidos grasos de 16,18 átomos de carbono o ambos. Estos ácidos grasos obtenidos son usados como precursores para la formación de membranas de los cloroplastos y otras membranas celulares, así como para la síntesis de lípidos neutros, principalmente triglicéridos, los cuales pueden acumularse bajo condiciones ambientales adversas o de crecimiento sub-óptimo (29).

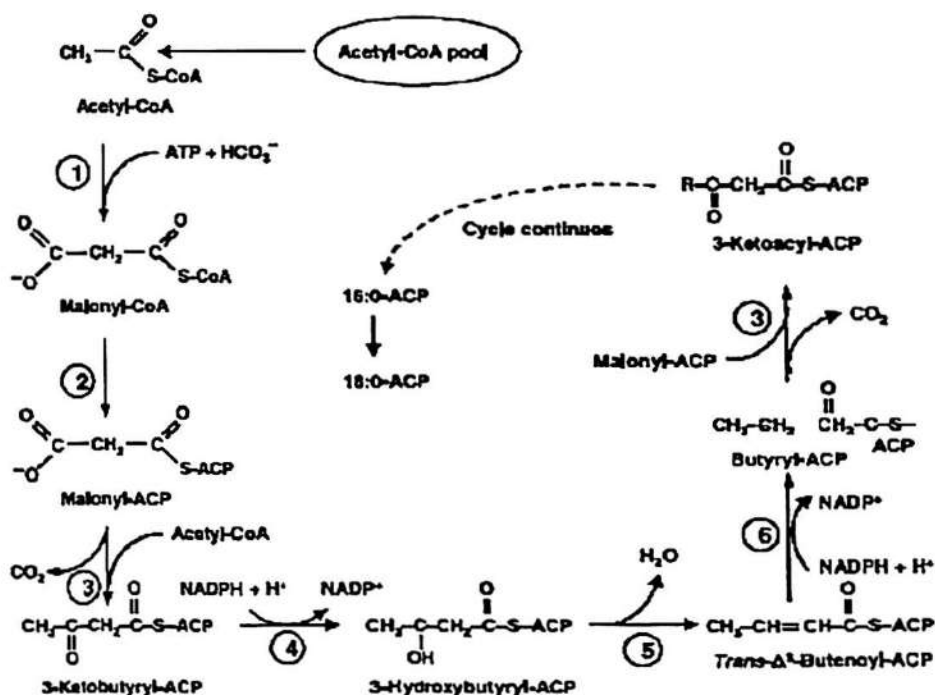


Figura 02. Síntesis de ácidos grasos en el cloroplasto: La acetil CoA entra en la ruta como sustrato para la acetil CoA carboxilasa (Reacción 1), así como para sustrato para la reacción de condensación inicial (reacción 3). La reacción 2, la cual es catalizada por malonil: ACP transferasa y transfiere malonil de la Coenzima A para formar malonina: ACP en el donador de carbono para las reacciones subsecuentes de elongación. Después de condensaciones subsecuentes el producto 3-ketoacil ACP es reducido (reacción 4), deshidratado (reacción 5) y reducido (reacción 6) por la 3 ketoacil-ACP reductasa, la 3 hidroxil ACP deshidrasa y en enoil ACP reductasa, respectivamente.

El paso comprendido en la síntesis de ácidos grasos es la conversión de acetil CoA a malonil CoA, catalizado por la acetil CoA carboxilasa. En el cloroplasto, la fotosíntesis proporciona una fuente endógena de acetil CoA, y más de una ruta puede contribuir al mantenimiento de la fuente de acetil CoA (29)

Una vez que la malonil-CoA es sintetizada, esta es transferida por la CoA:ACP transacetilasa a la proteína-transportadora acil (ACP, por sus siglas en inglés) del complejo multifuncional ácido-graso sintasa (FAS, por sus siglas en inglés). Bacterias y plantas tienen FAS tipo II, la cual es una proteína con multi-subunidades en la cual cada péptido es dissociable y puede catalizar una reacción enzimática, lo opuesto al FAS tipo I encontrada en la levadura y vertebrados, la cual es una proteína multifuncional. FAS cataliza la elongación de ácidos grasos al condensar las moléculas de malonil-CoA y acetil - CoA. ACP, una de las subunidades del FAS, contiene un grupo tiol que puede formar malonil-ACP vía la formación de tioésteres con la malonil-CoA, y posteriormente con el crecimiento de la cadena acilo para de esta forma asegurar su transporte. ACP puede también fijar al acetil formando acetil-ACP. A continuación, el grupo acetil es transferido a otra subunidad del FAS, la ketoacil-ACP sintasa (KAS), la cual cataliza la condensación de malonil-ACP o el crecimiento de la cadena acilo para formar Ketobutil-ACP o Ketoacil-ACP. Este compuesto resultante es primero transformado vía tres reacciones sucesivas, reducción, deshidratación y reducción, y luego condensando con otra malonil-CoA. El ciclo se repite hasta que la cadena saturada de ácido palmítico (16:0) o ácido esteárico (18:0) es formada. Por último, la ACP-tioesterasa rompe la cadena ácido y libera el ácido graso (28).

Para obtener cadenas largas o insaturadas de ácidos grasos, elongasas y desaturasas son requeridas, las cuales actúan sobre el palmitato o estearato. Estas enzimas se encuentran localizadas en la membrana del retículo endoplasmático y mitocondrias. Muchos experimentos se han llevado a cabo para modificar el contenido de lípidos en las plantas transgénicas con estas enzimas, como por ejemplo el aumento de la producción de ácidos grasos omega-3(26).

3.1.6.4. Biosíntesis de triglicéridos.

Para las eucariotas, la formación de triglicéridos, se lleva a cabo en organelos especializados como la mitocondria y plastidio (solo en plantas). En las células procariontas, la síntesis se lleva a cabo en el citoplasma de las células. Este proceso produce lípidos neutros. La biosíntesis de los triglicéridos en algas ha sido propuesta por la vía directa del glicerol (Figura. 03) (29)

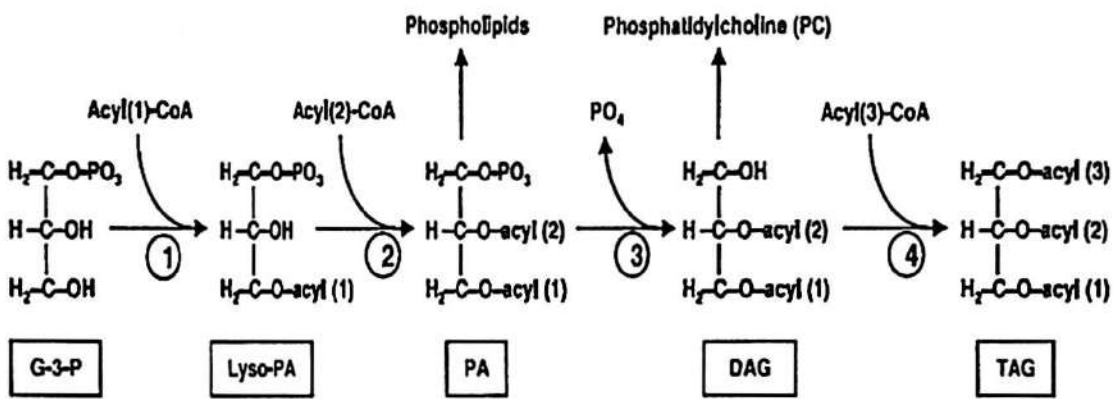


Figura 03. Esquema simplificado de la ruta de biosíntesis de triglicéridos en microalgas: Los ácidos grasos producidos en los cloroplastos son secuencialmente transferidos de CoA a las posiciones uno y dos de del glicerol-3-fosfato, resultando en la formación del metabolito central de ácido fosfático (PA, por su sigla en inglés), luego se da la desfosforilación del PA catalizado por una fosfatasa específica liberando diacilglicerol (DAG). En el paso final de la síntesis de triglicéridos (TAG), un tercer ácido graso es transferido a la posición 3 que es libre en la DAG, y la reacción es catalizada por la diacilglicerol transferasa, una reacción enzimática que es única para la biosíntesis de TAG.

El primer paso para la síntesis de triglicéridos es la condensación (acilación) del glicerol-3-fosfato (G-3_P, por sus siglas en inglés) con una acil-CoA para formar lisofosfatidato (Lyso-PA, por sus siglas en inglés), la cual es catalizada por la acil-CoA: glicerol-sn-3-fosfato acil transferasa (GPAT, por sus siglas en inglés). Esta enzima exhibe la actividad específica más baja de la ruta de síntesis de triglicéridos, y han sido sugeridas como potencialmente limitante de la velocidad de síntesis en este paso(27).

El lisofosfatidato es además condensando, catalizado por la GPAT con otro acil-CoA para producir fosfatidato (PA, por sus siglas en inglés), posteriormente, el PA puede ser fosforilado por la fosfatasa ácido fosfatidica (PAP, por sus siglas en inglés) para producir diacilglicerol. Por último, la síntesis de triglicéridos es catalizada por la acetil-CoA: diacilglicerol-transferasa, que incorpora el tercer acil-CoA en la molécula de diacilglicerol. esta enzima es también conocida como una importante regulador de la ruta metabólica. Los triglicéridos finalmente son almacenados como cuerpos lipídicos (26)

3.1.7. Dióxido de Carbono

Gas incoloro, inodoro y con un ligero sabor ácido, aproximadamente 1,5 veces más denso que el Aire. La molécula se compone de un átomo de carbono unido a dos átomos de oxígeno CO_2 , es soluble en agua en una proporción de un 0,9 de volumen del gas por volumen de agua a 20 °C.

Es producido por el uso de combustible fósil (petróleo, gas, carbón, etc.) y por el cambio de uso de la tierra (deforestación). Este gas ha contribuido a mantener una temperatura constante dentro de la tierra, sin embargo en la actualidad, es responsable de casi el 76 % del calentamiento global previsto para los próximos años.

3.1.7.1. Problemática del aumento del CO_2 atmosférico

El CO_2 es un gas incoloro, denso y poco reactivo y forma parte de la composición de la troposfera. Dada su presencia en la atmósfera y su falta de toxicidad, no deberíamos considerarlo como una sustancia que contamina, sin embargo se dan dos circunstancias que lo hacen un contaminante de importancia en la actualidad: es un gas que produce un importante efecto de atrapamiento del calor, el llamado efecto invernadero; y su concentración está aumentando en los últimos decenios por la quema de combustibles fósiles y grandes extensiones de bosques.

En los últimos 800 000 años, las concentraciones atmosféricas de dióxido de carbono ha aumentado niveles sin precedentes teniendo que las concentraciones de dióxido de carbono han aumentado en un 40% desde la era preindustrial debido a las emisiones derivadas de los combustibles fósiles y, a las emisiones netas derivadas del cambio de uso del suelo.

Este aumento en las concentraciones de CO_2 está trayendo como consecuencia la contaminación del aire y por consiguiente un riesgo para la salud humana, vegetación y fauna del planeta

3.1.7.2. Importancia del CO₂

La existencia del CO₂ es esencial para la vida, porque constituye la fuente de carbono , todo este CO₂ podría acumularse en la atmosfera si no fuera porque los seres fotosintéticos inhalan dióxido de carbono para extraer el carbono y fabricar, así, su alimento , que con la energía del sol y el agua lo transforman en materia orgánica, peor además, exhalan oxígeno, reponiendo así el oxígeno consumido en la respiración heterótrofa. A grandes rasgos, es mayor el desprendimiento de dióxido de carbono en la respiración que su consumo en la fotosíntesis. Esto podría llevar al desequilibrio y producir una acumulación progresiva de dióxido de carbono en la atmósfera. Pero para evitar este desequilibrio entra en juego un segundo factor de relevancia: la solubilidad del dióxido de carbono en agua. Si no hubiese CO₂ en la atmosfera, la temperatura media global seria de -10°C. Gracias a este CO₂ la temperatura media del planeta es de 19°C.

3.1.7.3. Fuente de carbono

La importancia de la fuente de carbono se debe a que aproximadamente la mitad de la biomasa microalgal es carbono y consecuentemente, se utilizan fuentes de carbono orgánico e inorgánico para el crecimiento microalgal. Una suplementación directa de CO₂ o mezclado con aire atmosférico ha demostrado aumentar sostensiblemente la productividad de algunos cultivos microalgales. La utilización de CO₂ o HCO₃ como fuente preferida para la fotosíntesis algal ha demostrado ser dependiente de la especie y del pH.

En los cultivos masivos de microalgas, la suplementación de CO₂ del aire es mejorada con 1-2% de CO₂, obteniendo los procesos de fermentación. La cantidad precisa de CO₂ para mantener el pH en los rasgos ideales puede ser monitoreada con flujómetros. El CO₂ puede ser suplementado desde cilindros de gas comprimido fijados con reguladores. (23)

3.2. Definición de términos básicos.

Microalgas: Las microalgas son organismos unicelulares microscópicos (2-200 μm), polifiléticos, su metabolismo puede ser autótrofo o heterótrofo y suelen ser eucariontes, aunque las cianobacterias procariontes son frecuentemente incluidas como microalgas Oleaginosas.

Microalgas oleaginosas: son aquellas microalgas que contienen ácidos grasos como componentes de su membrana, productos de almacenamiento, metabolitos y fuente de energía.

Biomasa: Materia total de los seres que viven en un lugar determinado, expresada en peso por unidad de área o de volumen.

Lípidos: Son biomoléculas orgánicas formadas básicamente por carbono e hidrógeno y generalmente, en menor proporción, también oxígeno. Además ocasionalmente pueden contener también fósforo, nitrógeno y azufre

Triglicéridos: Los triglicéridos son un tipo de lípidos formados por una molécula de glicerol esterificado con tres ácidos grasos, que suelen ser distintos.

Ácidos grasos: Son los componentes característicos de muchos lípidos y rara vez se encuentran libres en las células. Son moléculas formadas por una larga cadena hidrocarbonada de tipo lineal, y con un número par de átomos de carbono. Tienen en un extremo de la cadena un grupo carboxilo (-COOH).

Dióxido de Carbono: es un gas cuyas moléculas están compuestas por dos átomos de oxígeno y uno de carbono, y es considerado como uno de los principales gases causantes del efecto invernadero.

Calentamiento global: es el aumento de la temperatura media en la Tierra, la cual está ligado al aumento de gases de efecto invernadero.

Gases de efecto invernadero: Son gases cuya presencia en la atmosfera contribuyen al efecto invernadero. Los más importantes están presentes en la atmosfera de manera natural aunque su concentración puede verse modificada por las actividades antrópicas. Estos gases son:

- Vapor de agua (H₂O).
- Dióxido de carbono (CO₂).
- Metano (CH₄).
- Óxidos de nitrógeno (NO_x).
- Ozono (O₃).
- Clorofluorocarbonos (*artificiales*).

Fotosíntesis: La fotosíntesis consiste en la fabricación de alimentos por medio de la luz. En la fotosíntesis intervienen el agua, las sales minerales, el aire y la energía solar. Los únicos seres vivos capaces de crear su propio alimento son las plantas.

Medio de cultivo: Solución u otro substrato utilizado para cultivar microorganismos.

Nutrientes: son compuestos orgánicos y productos químicos inorgánicos, tales como CO₂, nitrógeno y fósforo, aunque también en ocasiones otros minerales como Potasio, Calcio o Manganeseo.

Tasa de crecimiento: Índice de crecimiento diario de la microalga.

3.3. Antecedentes

Las algas como materia prima para la producción de biocombustibles, se perfilan como la fuente más adecuada debido a su rápido crecimiento, alto contenido de aceite o alta productividad (mayor que las plantas), capacidad de fijar CO₂, menores requerimientos de condiciones de cultivo y nutrientes, no compite por suelos ni con alimentos. Así mismo, los análisis de ciclo de vida previos desarrollados en algas indican una obtención mayor de energía con unos requerimientos materiales menores y por tanto unos impactos ambientales muy por debajo de las otras materias primas. Es por ello que es importante analizar el efecto del CO₂ en el cultivo de microalgas, ya que cada cepa tiene una respuesta diferente a las concentraciones de CO₂. Por lo tanto la concentración de CO₂ aplicado en un medio de cultivo dependerá de la especie, la presencia del porcentaje indicado de CO₂ en el cultivo de microalgas, tiende a aumentar el contenido de lípidos cuando esta se cultiva en presencia de 6-8 % de CO₂, la producción de biomasa tiende a ser de hasta 0,376 g/ l/d, mientras que la presencia de 9 a 10 % de CO₂ presenta menor producción de 0,15 g/l/d (36,37).

Algunos estudios informan de que las microalgas son los únicos organismos fotosintéticos capaces de utilizar directamente el CO₂ de una corriente de gases de combustión, como puede ser el de centrales térmicas, sin necesidad de tratamientos previos, ya que son resistentes a altas concentraciones de CO₂. A diferencia de los cultivos vegetales o árboles, las microalgas mejoran su productividad con el aumento, de la concentración de CO₂ respecto a la atmosférica (38). Se han investigado también los efectos de concentraciones extendidas de CO₂ (5-50%) en la tasa de crecimiento y de la productividad de ácidos grasos intracelulares en microalgas, obteniendo que la composición de ácidos grasos y el contenido de microalgas pueden variar significativamente de acuerdo a las diferentes concentraciones de CO₂ (39).

Otros estudios en microalgas tales como *C. kessleri*, *S. obliquus*, *Spirulina* sp. y *C. vulgaris*. Revelan que algunas microalgas pueden tener un mejor crecimiento bajo una concentración menor al 6% de CO₂ (40). De Morais and Costa (40) Corroboran también que en *C. vulgaris* el aumento de la concentración de CO₂ de 0.036% a 2% puede incrementar la composición de ácidos grasos saturados. Tsuzuki (41) Además encontró que el contenido de ácidos grasos de *Dunaliella salina* y *Thalassiosira Weissflogii* parecía disminuir con el aumento de las concentraciones de CO₂ de 2% a 10% y 5% a 20%, respectivamente.

Widjaja *et al* (42) mostró que las concentraciones de CO₂ juegan un papel importante en el aumento del contenido lipídico, biomasa y rendimiento, en sus resultados, la concentración de CO₂ más significativa para la producción de un alto contenido de lípidos es de entre 0,33 y 3,33 %. Sin embargo, (43) mostró que el cultivo de microalgas aireadas con 2-15 % de CO₂ dio lugar a una tasa de crecimiento de microalgas de hasta 0,66 por día.

Rosenberg y Schenk dicen que las microalgas oleaginosas, son consideradas como fuente de biocombustibles de segunda generación, que contribuyen de manera importante a la fijación de CO₂ y pueden ser utilizadas para producir una amplia gama de biocombustibles, tales como el biodiesel, bioetanol, biometano y biohidrógeno. (44) y (42) lo cual ayudaría a satisfacer la demanda energética que se estima crecerá un 58% de 2001 a 2025. Este se deberá a los países en vías de desarrollo. La mayor parte de esta demanda de energía se suplirá con petróleo, gas natural y carbón, mientras que las energías renovables, solo alcanzarán un 20% del consumo total. Si estas predicciones se cumplen, el aumento de emisiones mundiales de CO₂ será eminente, los cuales podrían causar grandes daños al medio ambiente y nuestra salud.

Existiendo esta necesidad de disminuir las emisiones de CO₂ atmosférico y la creciente demanda energética, surge la importancia de la utilización de las microalgas para la biofijación de CO₂ y producción de biodiesel pudiéndose observar que la mayor parte de los estudios realizados recientemente se centraron en la optimización de la biomasa y la productividad de lípidos de diversas cepas de microalgas con diferente concentración de CO₂, comprobando así que las microalgas podrían utilizar CO₂ de manera eficiente mediante la conversión a varios productos valiosos, tales como lípidos, carbohidratos, proteínas y otros pigmentos.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Lugar y desarrollo de la investigación.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP), ubicada en la Av. José Abelardo Quiñones km 2,5, distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas, Departamento de Loreto. La extracción de lípidos totales se realizó en la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonia Peruana (CIRNA - UNAP). Ubicado en la Av. José Abelardo Quiñones km 2,0 distrito de San Juan Bautista, pasaje Los Paujiles s/n. AA.HH Nuevo San Lorenzo del Distrito de San Juan Bautista.

4.2. Recursos utilizados.

4.2.1. Materiales.

- ✓ Placas Petri (15x 100 mm, Duran).
- ✓ Frascos Erlenmeyer de 500 y 1000 ml.
- ✓ Mandil y guantes de laboratorio.
- ✓ Láminas portaobjetos y cubreobjetos
- ✓ Gradillas
- ✓ Mascarilla
- ✓ Gorro
- ✓ Papel de Aluminio
- ✓ Pipetas de 20 hasta 1000 μ l (ml)
- ✓ Probetas
- ✓ Tips de 100,200 y 1000 μ l (ml)
- ✓ Alcohol (70% y 96%)
- ✓ Microtubos (1.5 ml)
- ✓ Tubos de 15ml

4.2.2. Equipos.

- ✓ Computadora
- ✓ Balanza analítica marca Sartorius
- ✓ Centrifuga Kert Lab
- ✓ Autoclave Yamato
- ✓ Cámara fotográfica
- ✓ Microscopio de fluorescencia marca Zeiss.
- ✓ Microscopio óptico marca Zeiss.
- ✓ Cámara de Neubauer.
- ✓ Estufa.
- ✓ Cabina de flujo laminar marca Telstar.
- ✓ Bombas de aireación.

4.2.3. Reactivos.

- ✓ Rojo de Nilo.
- ✓ Alcohol isopropílico
- ✓ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- ✓ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- ✓ NaHCO_3
- ✓ K_2HPO_4
- ✓ NaNO_3
- ✓ Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)
- ✓ Citrato férrico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot \text{Xh}_2\text{O}$)
- ✓ NaEDTA
- ✓ H_3BO_3
- ✓ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- ✓ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- ✓ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- ✓ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- ✓ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- ✓ Metasilicato de sodio (Na_2SiO_3)
- ✓ Ácido clorhídrico (HCl)

- ✓ Cloroformo
- ✓ Etanol
- ✓ NaCl

4.2.4. Programas.

- ✓ ANOVA
- ✓ ZEN (programa de visualización y procesamiento de imágenes conectado al microscopio de epifluorecencia)
- ✓ Excel de Microsoft Office

4.3. Diseño de la investigación

El diseño de la investigación fue de tipo experimental, el cual consistió en el cultivo de las microalgas *Ankistrodesmus nannosele*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Scenedesmus quadricauda* en medio CHU, inicialmente en matraces Erlenmeyer, cuello estrecho graduados de 500 ml y conforme se fue incrementando el crecimiento microalgal el cultivo se transfirió a frascos de mayor volumen. Cuando se obtuvo la biomasa necesaria se expusieron las muestras a diferentes tiempos de CO₂ (4, 6 y 8 min) para evaluar la producción de biomasa y acumulación de lípidos totales. Cada uno de estos tratamientos se realizó por triplicado, Posteriormente, cumplido el tiempo respectivo se cosechó las microalgas por centrifugación para realizar el análisis de lípidos totales.

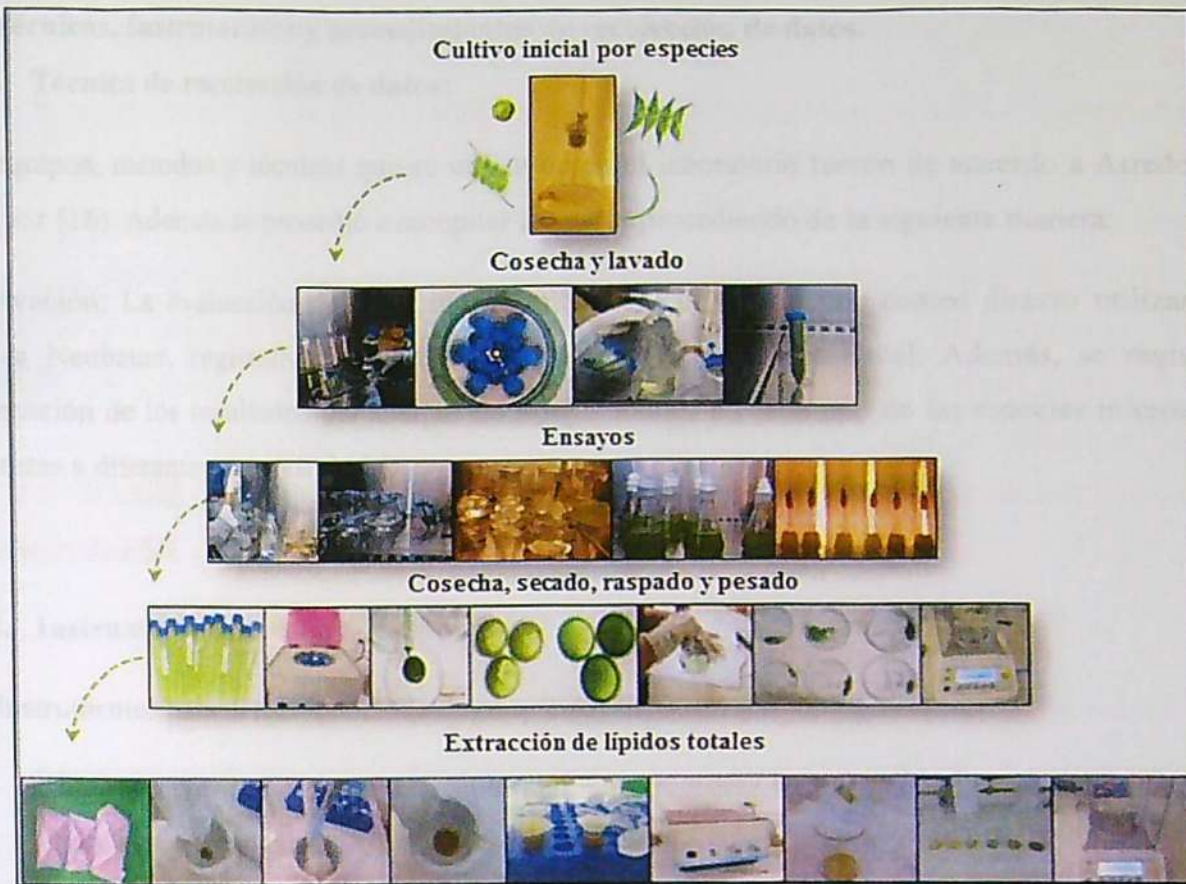


Figura 04. Flujograma de inducción de lípidos en cinco especies de microalgas amazónicas sometidas a diferentes tiempos de exposición al CO₂

4.4. Población y muestra.

4.4.1. Población.

Constituidas por las especies de microalgas de agua dulce de la amazonía peruana.

4.4.2. Muestra.

Representada por cuatro especies de microalgas oleaginosas (*Ankistrodesmus nannoselene*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Scenedesmus quadricauda*) que fueron proporcionadas por el banco de cepas del laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP)

4.5. Técnicas, Instrumentos y procedimientos de recolección de datos.

4.5.1. Técnica de recolección de datos:

Los equipos, métodos y técnicas que se utilizaron en el laboratorio fueron de acuerdo a Arredondo y Vázquez (16). Además se procedió a recopilar los datos procediendo de la siguiente manera:

Observación: La evaluación del crecimiento microalgal se realizó por conteo directo utilizando la cámara Neubauer, registrándose los datos en fichas del programa Excel. Además, se registró la información de los resultados del análisis de lípidos totales en cada uno de las especies microalgales expuestas a diferentes tiempos de CO₂

4.5.2. Instrumento de recolección de datos:

Los instrumentos para la recolección de datos que se utilizaron son los siguientes:

- a). Fichas o guías de observación. Se utilizó para registrar la información obtenida de la tasa de crecimiento microalgal.
- b). Los Equipos que se utilizaron para obtener directamente el registro de datos fueron el Microscopio de epifluorescencia, el microscopio compuesto y la cámara Neubauer, entre otros.

4.5.3. Procedimiento Experimental.

4.5.3.1. Cultivo y cosecha microalgal.

Se cultivaron cuatro especies de microalgas oleaginosas en medio CHU (45). Las cuatro cepas fueron cultivadas en matraces de 500 mL con 200 mL de medio hasta su saturación. Cada matraz estuvo bajo aireado constante, a 26°C y un fotoperiodo de (12:12) luz/oscuridad con una intensidad lumínica de 100 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Las muestras se mantuvieron en cultivo hasta observarse proliferación de microalgas, para posteriormente proseguir a la cosecha, que consistió en distribuir 15 mL del cultivo en 12 tubos de 15 mL para centrifugar a 4000 rpm a 4°C por 10 min. Se descartó el sobrenadante e inmediatamente se añadió más cultivo en los mismos tubos y se centrifugó bajo las condiciones indicadas. Estos pasos se repitieron hasta obtener todo el precipitado microalgal el cual se transfirió a matraces de 250 mL para los ensayos experimentales.

4.5.3.2. Evaluación de los bioensayos con diferentes tiempos de exposición de CO₂

2ml de biomasa obtenida de la cosecha de cada especie de microalga fue colocada en matraces de 250 ml para los ensayos respectivos, que contó con un grupo control: 200ml de medio más 2ml de biomasa y un grupo problema: 200ml de medio más 2ml de biomasa con diferentes tiempos de exposición de CO₂, (4min, 6min y 8min) usando para ello un distribuidor de gas provisto con una válvula reguladora de CO₂ el cual se fijó al nivel de 10 PSIG (libra por pulgada cuadrada). Estos ensayos se realizaron por triplicado y fueron sometidos a condiciones de aireación constante, a temperatura de 26° C, fotoperiodo de 12:12 h, con intensidad lumínica de 100 E/m²/s. y a una humedad relativa de 46%. En esta fase se evaluó la tasa de crecimiento microalgal con lecturas diarias, usando para ello el hematocitómetro. La evaluación se realizó por 7 días.

4.5.3.3. Cosecha de la Biomasa microalgal.

Seguido de los 7 días de evaluación se cosecharon las microalgas como se indicó previamente, la biomasa obtenida fue secada a 50 °C por 24 horas bajo condiciones de oscuridad

4.5.3.4. Extracción y análisis de lípidos totales.

La extracción de lípido total se realizó según Yu *et al.*, (46). Que consistió en transferir la biomasa seca a morteros para su trituración con 8 mL de una mezcla de cloroformo:metanol (2:1). El extracto obtenido se transfirió a microtubos de 2 mL. La solución se homogenizó en vortex por 30 seg y centrifugo a 10000g a 4°C por 5 min. La fase clorofórmica se transfirió a vasos de precipitado de peso conocido. Los restos celulares y otros componentes fueron retenidos en la fase intermedia (entra fases acuosa y clorofórmica) y fueron tratados varias veces con la solución extractora de lípidos (cloroformo:metanol) después de su homogenización en el vortex y centrifugación. Todos los extractos con solventes orgánicos fueron filtrados y transferidos al mismo vaso de precipitado. Los solventes orgánicos se evaporaron del vaso de precipitado en un hotplate a 50°C por 4 horas. Luego los componentes lipídicos retenidos en el vaso de precipitado fueron secados a 50°C por 4 horas. Finalmente, el vaso de precipitado se atemperó a 25°C y determinar su peso. Por diferencia de peso del vaso de precipitado con y sin los lípidos se determinaron la cantidad de lípidos totales obtenidos. Con la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de lípidos (\%)} = \frac{P_L}{P_M} \times 100$$

Donde PL es el peso seco de los lípidos totales y PM es el peso seco de las microalgas.

4.6. Análisis de datos.

Se determinó el promedio, desviación estándar, para conocer si existen diferencias estadísticas significativas en la producción de lípido total a través del programa ANOVA con prueba de HSO de Tukey. Mientras que para la elaboración de los gráficos de producción de biomasa y la tasa de crecimiento microalgal se empleó el programa Excel de Microsoft Office.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.1. Tasa de crecimiento (μ) de dos especies microalgales oleaginosas sometidas a diferentes tiempos de exposición al CO_2

En cuanto a los valores de la tasa de crecimiento de las cuatro especies microalgales evaluadas se observó un aumento gradual en tres especies microalgales con respecto al grupo control, a excepción de *Chlorella sp.* la cual presentó la mayor tasa de crecimiento en su grupo control (0.18 d^{-1}) con respecto a los demás tratamientos de la misma especie y de las cuatro especies evaluadas.

Tabla 01. Valores promedio de la tasa de crecimiento (μ) de cuatro especies microalgales oleaginosas sometidas a diferentes tiempos de exposición al CO_2

Especies	Tasa de Crecimiento (μ) (Día^{-1})			
	Control	4min	6 min	8 min
<i>Scenedesmus sp.</i>	0.09	0.12	0.07	0.08
<i>Scenedesmus quadricauda.</i>	0.12	0.13	0.13	0.15
<i>Ankistrodesmus nannoselene</i>	0.07	0.05	0.09	0.08
<i>Chlorella sp.</i>	0.18	0.14	0.12	0.13

1.2. Perfil de crecimiento de cuatro especies microalgales oleaginosas sometidas a diferentes tiempos de exposición al CO_2

Con respecto a la curva de crecimiento de las cuatro especies de microalgas evaluadas cada una de ellas muestran un perfil diferencial. Tal como se evidencia en la figura 05 de *Scenedesmus sp.* que la especie cultivada a diferentes tiempos de exposición al CO_2 presenta fluctuaciones en los tres tratamientos y el control, ya que conforme transcurrieron los días la curva se incrementan gradualmente diferenciándose entre los tratamientos el de 6 minutos de exposición al CO_2 el cual al sexto día presenta su fase exponencial aumentando su densidad celular (con $22,70 \times 10^6$ célula/ml). Así mismo, en el día 1 se observa una disminución en la densidad celular en los tres tratamientos y el control debido al estado de estrés a la que fueron sometidos previos a la evaluación, este periodo es llamado la fase de adaptación o acondicionamiento. A partir de la cual, comenzaron a tener un crecimiento progresivo empezando el día 4 para el control con $9,56 \times 10^6$ célula/ml, sin embargo para los tratamientos con diferentes tiempos de exposición al CO_2 4, 6 y 8 minutos se mostró crecimiento al tercer día ($8,98 \times 10^6$ célula/ml, $16,06 \times 10^6$ célula/ml y $11,80 \times 10^6$ célula/ml respectivamente) se observó también diferencias

significativas entre estos tres tratamientos al tercer día. Además, se encontraron también diferencias altamente significativas en el tratamiento de 6 minutos al quinto día donde se obtuvo la mayor densidad celular con $22,70 \times 10^6$ célula/ml.

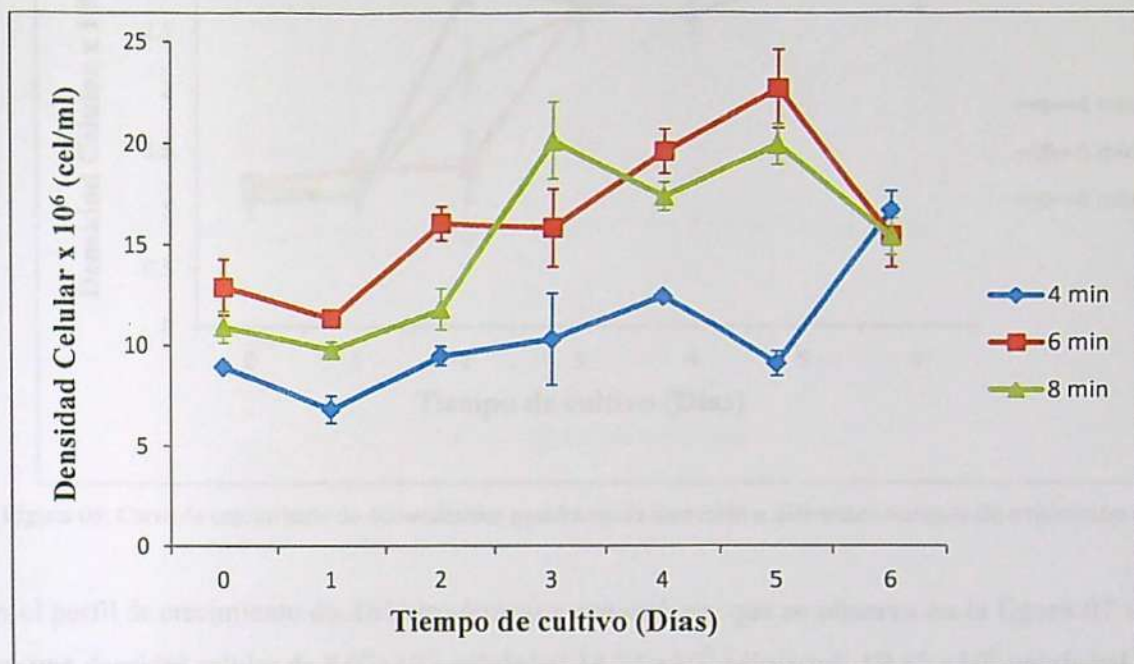


Figura 05. Curva de crecimiento de *Scenedesmus.sp* sometida a diferentes tiempos de exposición al CO_2

La figura 06 muestra el perfil de crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* cultivada a diferentes tiempos de exposición al CO_2 . En la cual se puede observar una fase de adaptación breve en los tratamientos de 4 y 6 minutos de exposición, sin embargo el grupo control y el tratamiento de 8 minutos, presentaron su fase de adaptación al día 1 a partir del cual se dio un crecimiento gradual. Se observa también que en el grupo control alcanzó su fase exponencial el día 4, en el tratamiento de cuatro minutos, la fase exponencial se presentó al tercer día a partir del cual se da una fase estacionaria. Así mismo se observa que en los tratamientos 6 y 8 minutos se da una fase estacionaria al sexto día de evaluación. En cuanto a las diferencias significativas observamos todos los tratamientos la presentan sin embargo el tratamiento de 8 minutos de exposición presenta una diferencia altamente significativa al quinto día.

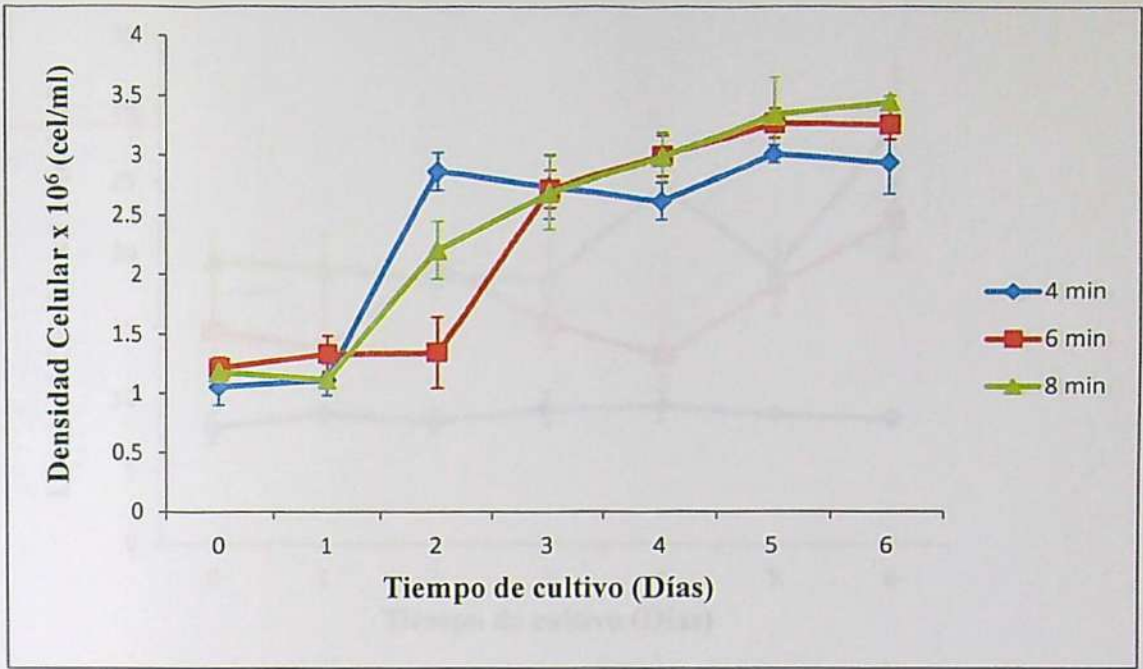


Figura 06. Curva de crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* sometida a diferentes tiempos de exposición al CO₂

En el perfil de crecimiento de *Ankistrodesmus nannosele*, que se observa en la figura 07 se inició con una densidad celular de $8,07 \times 10^6$; célula/ml $14,74 \times 10^6$ célula/ml; $19,52 \times 10^6$ célula/ml y $8,49 \times 10^6$ célula/ml para los tratamientos 4, 6, 8 minutos y el grupo control respectivamente, posteriormente se observa una fase de adaptación, la cual en el tratamiento de 4 minutos y el grupo control, se dio en el transcurso de las primeras horas posteriores a su siembra, sin embargo en los tratamientos 6 y 8 minutos esta fase se prolongó al día 1 para seis minutos y al día 3 para ocho minutos. La mayor densidad celular se obtuvo al sexto día con el tratamiento de 8 minutos ($29,01 \times 10^6$ células/ml). Observándose además que este tratamiento presenta diferencias altamente significativas al sexto día en comparación con los otros minutos evaluados.

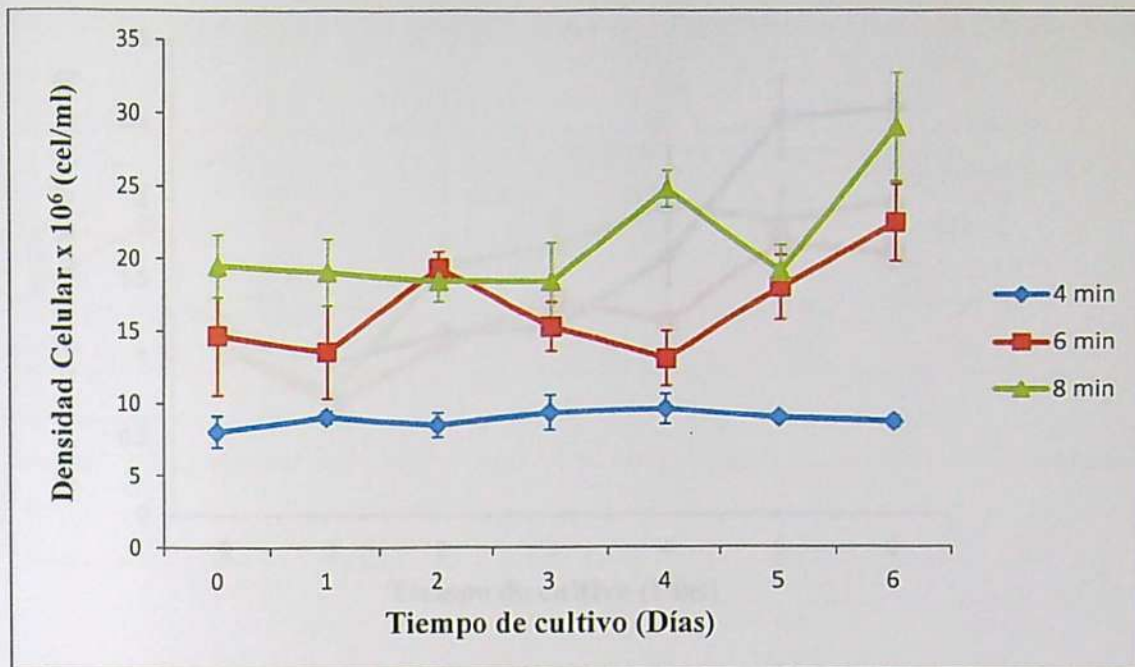


Figura 07. Curva de crecimiento de *Ankistrodesmus nannoselele* sometida a diferentes tiempos de exposición al CO₂

En la figura 08 se observa el perfil de crecimiento de *Chlorella sp.* sometido a diferentes tiempos de exposición al CO₂ se observa una densidad celular inicial similar en todas las condiciones, la fase de acondicionamiento se alcanzó al día 1, en el grupo control se observó una fase estacionaria hasta el día tres. Los tratamientos 4, 6 y 8 minutos, presentaron una fase estacionaria al quinto y sexto día de exposición al CO₂; la máxima densidad celular se obtuvo con el grupo control al sexto día con 3.37×10^6 células/ml. Además se observa en esta figura que el tratamiento de 8 minutos presentó diferencia significativa al cuarto día de exposición al CO₂, así mismo observamos que el tratamiento de 4 minutos presentó diferencias altamente significativas al quinto día de exposición con respecto a los otros tratamientos.

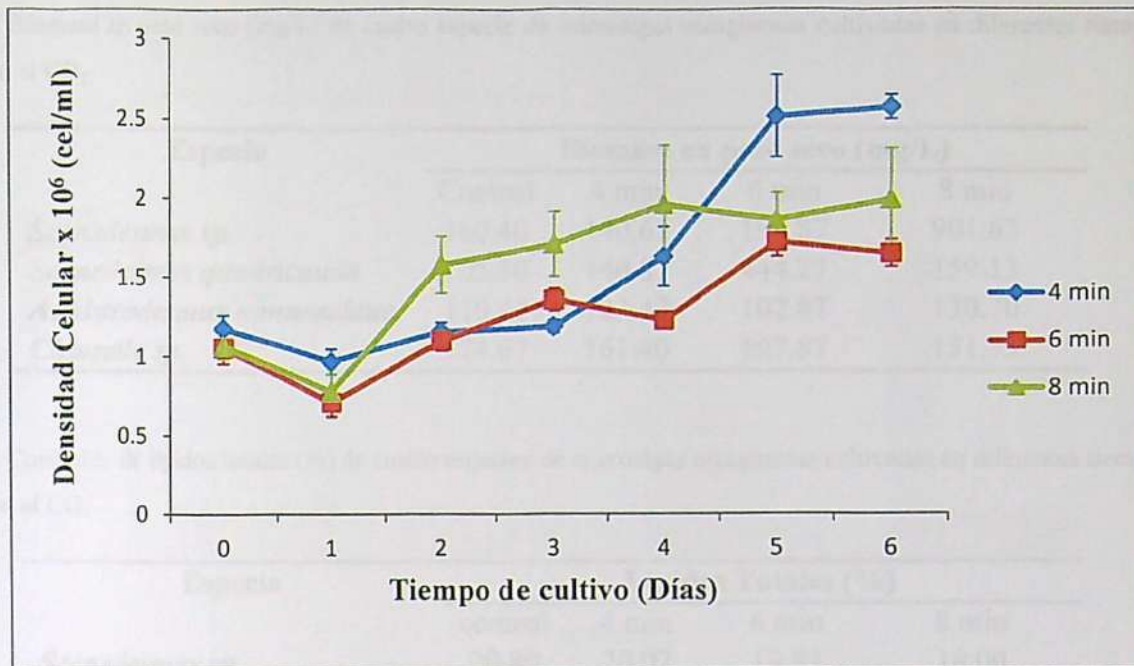


Figura 08. Curva de crecimiento de *Chlorella sp.* sometida a diferentes tiempos de exposición al CO₂

1.3. Producción de biomasa y contenido de lípidos totales en cuatro especies microalgales oleaginosas sometidas a diferentes tiempos de exposición al CO₂

La especie *Scenedesmus sp.* sometida a 8 minutos de exposición al CO₂ mostró una mayor producción de biomasa con respecto a los otros tratamientos (901.63 mg/L), siendo notorio que la exposición al CO₂ indujo a una mejor producción de biomasa en esta especie. Así mismo, la especie *Ankistrodesmus nannosele* obtuvo la menor producción de biomasa con respecto a los tiempos de exposición y el control en el minuto 6 (102.92 mg/L). Estas especies también mostraron un aumento en el contenido de lípidos como se puede verificar en la tabla 3, siendo los tratamientos 2 y 3 (6 y 8 min) los que mostraron un mayor porcentaje de lípidos en la especie *Chlorella sp.* con 47.60% y 36.07% respectivamente. Sin embargo, la especie *Scenedesmus quadricauda* mostró un menor contenido lipídico en el grupo control con 10.00%. Siendo claro que la exposición al CO₂ indujo a una mejor producción de biomasa y contenido lipídico.

Tabla 02. Biomasa en peso seco (mg/L) de cuatro especie de microalgas oleaginosas cultivadas en diferentes tiempos de exposición al CO₂

Especie	Biomasa en peso seco (mg/L)			
	Control	4 min	6 min	8 min
<i>Scenedesmus sp.</i>	160.40	140.67	195.87	901.63
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	105.50	140.87	444.27	159.13
<i>Ankistrodesmus nannoselene</i>	110.47	123.47	102.97	130.70
<i>Chlorella sp.</i>	174.67	161.40	107.87	131.73

Tabla 03. Contenido de lípidos totales (%) de cuatro especies de microalgas oleaginosas cultivadas en diferentes tiempos de exposición al CO₂

Especie	Lípidos Totales (%)			
	control	4 min	6 min	8 min
<i>Scenedesmus sp.</i>	20.80	20.07	19.93	18.00
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	10.00	12.53	12.53	12.27
<i>Ankistrodesmus nannoselene</i>	23.93	28.67	27.73	26.40
<i>Chlorella sp.</i>	20.93	23.40	47.60	36.07

La producción de biomasa en diferentes tiempos de exposición al CO₂ mostró diferencias estadísticas significativas, a los 6 y 8 minutos de exposición al CO₂ como se evidencia en la figura 09. Donde observamos que en el tratamiento 1 (4 min de exposición) se obtuvieron una producción casi uniforme, no presentando diferencias significativas, por el contrario en el tratamiento 2 (6 min de exposición) la especie *Scenedesmus quadricauda* mostró diferencias significativas en la producción de biomasa ($p=0,34$), con respecto a las otras especies evaluadas siendo esta especie la que obtuvo una mayor producción de biomasa en el tratamiento 2 (444.27 mg/L) así mismo se observa que el tratamiento 3 (8 min de exposición) la especie *Scenedesmus sp.* presentó diferencias altamente significativas en comparación con las otras tres especies evaluadas a los 8 min de exposición al CO₂ ($p=0,015$), siendo esta especie en este tratamiento la que tuvo una mejor producción de biomasa con respecto a las otras especies y tratamientos evaluados (901.63 mg/L).

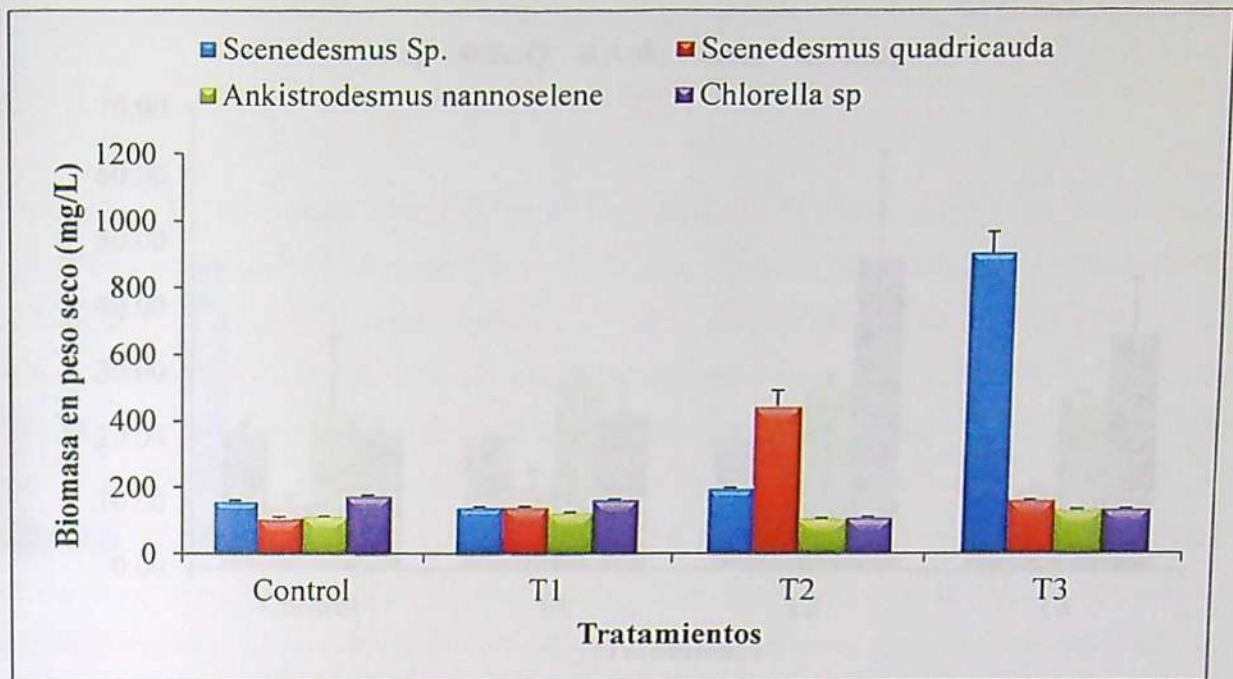


Figura09. Contenido de Biomasa en peso seco (mg/L) de cuatro especie de microalgas oleaginosas cultivadas en diferentes tiempos de exposición al CO₂

En cuanto a la producción de lípidos totales observamos que existen diferencias estadísticas significativas en los tratamientos 2 y 3. En cuanto al tratamiento 1 (4 min de exposición) se observa que no existen diferencias significativas entre las especies *Scenedesmus sp* y *Scenedesmus quadricauda*, Sin embargo en este mismo tratamiento se observa que la especie *Ankistrodesmus nanmoselene* presentó diferencias significativas en comparación con las especies ya mencionadas ($p=0,76$), por otra parte en el tratamiento 2 (6 min de exposición) que *Chlorella sp.* presenta diferencias altamente significativas con respecto a las otras especies evaluadas ($P=0,17$) obteniendo esta la mayor producción de lípidos con respecto a los otros tratamientos y especies (47.60%) , seguida por *Ankistrodesmus nanmoselene* quien presenta diferencias significativas con respecto a *Scenedesmus sp* y *Scenedesmus quadricauda*, Similar comportamiento se observa en tratamiento 3 (8min de exposición) donde *Chlorella sp.* presentó diferencias altamente significativas en comparación con las otras tres especies evaluadas, seguida por *Ankistrodesmus nanmoselene* quien presenta diferencias significativas entre las otras dos especies restantes.

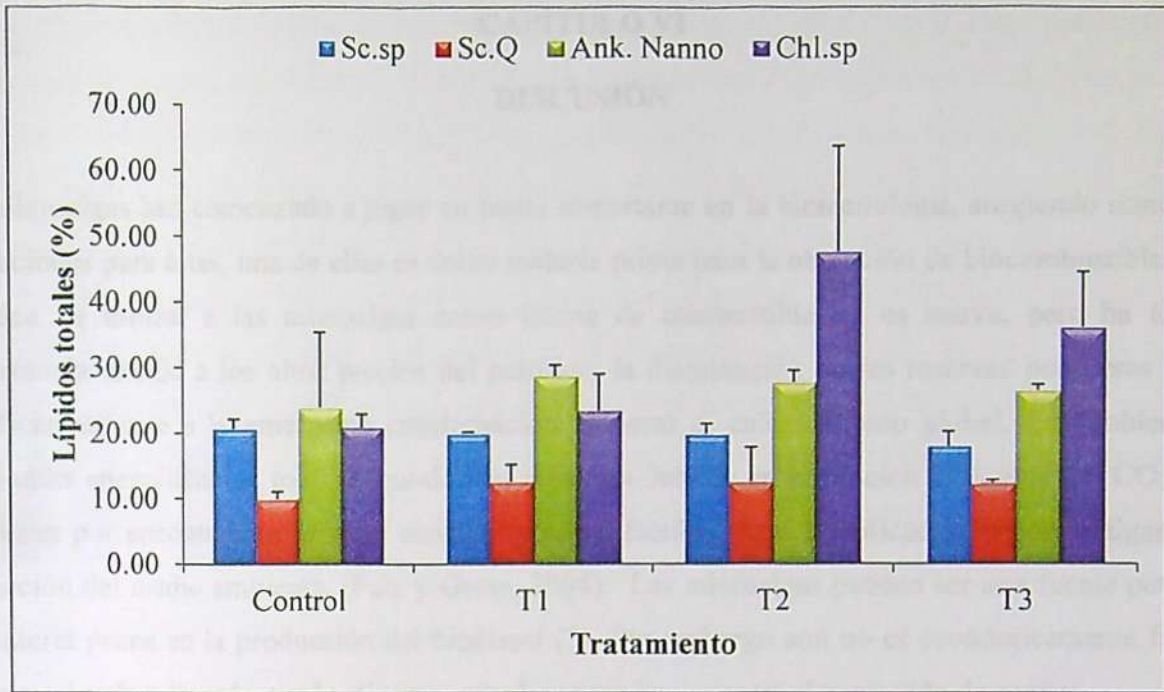


Figura 10. Contenido de lípidos totales (%) de cuatro especies de microalgas oleaginosas cultivadas en diferentes tiempos de exposición al CO₂

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

Las microalgas han comenzado a jugar un papel importante en la biotecnología, surgiendo numerosas aplicaciones para éstas, una de ellas es como materia prima para la obtención de biocombustibles (47). La idea de utilizar a las microalgas como fuente de combustible no es nueva, pero ha tomado importancia debido a los altos precios del petróleo, la disminución de las reservas petroleras y más significativamente a la emergente consternación respecto al calentamiento global. Los gobiernos y compañías energéticas de todo el mundo han mostrado interés en la fijación biológica del CO₂ y se esfuerzan por encontrar un proceso económicamente factible, para la aplicación de microalgas en la protección del medio ambiente. (Pulz y Gross, 2004). Las microalgas pueden ser una fuente potencial de materia prima en la producción del biodiesel (3). Sin embargo aún no es económicamente factible por lo cual se han llevado a cabo diversos estudios para incrementar el contenido de aceites.

Los resultados de esta investigación muestran que la producción de lípidos totales fue mayor en *Chlorella sp.* a los 6 minutos de exposición al CO₂ con un valor de 47.60% la cual presenta diferencias altamente significativas con respecto a las otras especies y tratamientos evaluados (P=0,17) coincidiendo con la investigación de Tsuzuki *et al* 1990(41) quienes obtuvieron una mayor producción de lípidos totales en *Chlorella vulgaris* sometida a altas y bajas concentraciones de CO₂ 34.7% y 35.2% respectivamente, esto es debido a que las microalgas reaccionan de manera diferente ante factores estresantes, en este caso *Chlorella vulgaris*. presentó una mayor tolerancia al CO₂ en comparación con las otras especies sometidas a evaluación, sin embargo, la mejor producción se dio a concentraciones menores al 2% de aire enriquecido con CO₂. De Morais y Costa, 2007 (40) Corroboraron también que en *C. vulgaris* el aumento de la concentración de CO₂ de 0.036% a 2% puede incrementar la composición de ácidos grasos saturados, siendo así, Rosenberg y Schenk, 2008 (44,48) afirman que las microalgas oleaginosas, son consideradas como fuente de biocombustibles de segunda generación, (combustibles obtenidos a partir de biomasa procedente de residuos de cultivos) que contribuyen de manera importante a la fijación de CO₂ y pueden ser utilizadas para producir una amplia gama de biocombustibles. En cuanto a la biomasa las mayores producciones obtenidas fueron de 901.63 mg/L y 444.27 mg/L en las especies *Scenedesmus sp* a los 8 minutos de exposición al CO₂ y *Scenedesmus quadricauda* a los 6 minutos de exposición al CO₂, obteniendo diferencias altamente significativas en *Scenedesmus sp* a los 8 minutos en comparación con las otras tres especies evaluadas

($p=0,015$) , esto concuerda con los resultados de Quevedo *et al.*, 2008 (49) quienes obtuvieron una producción de biomasa de 400 mg/L con la especie *Scenedesmus sp* en un medio enriquecido al 1% de CO₂ (con bicarbonato de sodio NaHCO₃), esta producción se puede deber a la baja solubilidad del NaHCO₃ en el medio de cultivo y a la baja permeabilidad de éste a través de la membrana celular en comparación con el CO₂ utilizado convencionalmente. Así mismo los valores obtenidos con la especie *Scenedesmus sp*. son también mayores a la reportada por Kim *et al*, 2007 (50) donde se cultivaron la microalga *Scenedesmus sp* en el medio KEP I (3% purín) el cual favorece el crecimiento algal , además se aireó constantemente para proveer un crecimiento de 0,197 g/L (197 mg/L) pero menores a la reportada por Greque y Vieira, 2007 (51) donde se obtienen 1,800 g/L (1800 ml/L) de *Scenedesmus obliquus*, esta mejora en la producción de biomasa se puede deber a que esta especie fue cultivada en fotobiorreactores de 2L provistos con CO₂ constante, lo cual brindó un ambiente estable para su óptimo desarrollo.

Con respecto a los valores obtenidos en la tasa de crecimiento de las cuatro especies microalgales evaluadas se observó que esas presentaron un aumento gradual en tres de las cuatro especies microalgales evaluadas con respecto al grupo control, siendo la excepción la especie microalgal de *Chlorella sp*. la cual obtuvo la mayor tasa de crecimiento en el grupo control (0.18 d⁻¹) con respecto a los demás tratamientos de la misma especie y de las cuatro especies de microalgas evaluadas,. Estudios hechos por De Morais *et al*, 2007 (40) en microalgas tales como *C. kessleri*, *S. obliquus*, *Spirulina sp.* y *C. vulgaris*. revelan que algunas microalgas pueden tener un mejor crecimiento bajo una concentración menor al 6% de CO₂. Sin embargo Chiu *et al*, 2009 (43)mostró que el cultivo de microalgas aireadas con 2-15 % de CO₂ dio lugar una tasa de crecimiento de microalgas de hasta 0,66 por día, esto probablemente se debió a que la microalga a evaluar fue sometida a una pre-adaptación al CO₂ antes de ser puesta en cultivo semicontinuo. Otros estudios realizados por Pérez, 2015 (52) revelaron que la especie *Chlorella sp*. obtuvo el menor valor en la tasa de crecimiento, no siendo esta sometidas a CO₂, por lo cual podemos deducir que los tratamientos con CO₂ pueden llegar a estimular a que las microalgas tengan una mejor tasa de crecimiento, producción de biomasa y acumulación de lípidos totales.

En el perfil o curva de crecimiento de las cuatro especies de microalgas evaluadas cada una de ellas muestran un perfil diferencial. En el perfil de crecimiento de la especie *Scenedesmus sp*. se pudo observar fluctuaciones en los tres tratamientos y en el grupo control, alcanzando su mayor densidad celular a los seis minutos de exposición al CO₂ al sexto día, se observa además que los tratamientos 4,

6 y 8 de exposición, presentó diferencias significativas al tercer día , así mismo, se encontraron también diferencias altamente significativas en el tratamiento de 6 minutos al quinto día donde se obtuvo la mayor densidad celular , hechos que coinciden con los resultados obtenidos por Vásquez, 2015 (53) quien obtuvo la mayor densidad celular con la especie *Scenedesmus sp.* al séptimo día de evaluación, a diferentes intensidades de luz. En *Scenedesmus quadricauda* el perfil mostró una fase de adaptación al día 1 y su máxima densidad celular al sexto día. Similar al resultado obtenido por Paredes, 2014(54) la cual presentó una fase de acondicionamiento al primer día a partir del cual se dio un crecimiento gradual y una máxima densidad celular al día 6 de evaluación, esto se debe al periodo de estrés al cual fue sometida la microalga durante la cosecha anterior a los tratamientos, una vez adaptada, la microalga presentó la fase de crecimiento exponencial, donde comienza a darse un aumento en la densidad celular. En cuanto al perfil de crecimiento de *Ankistrodesmus nannoselene* se obtuvo la mayor densidad celular al séptimo día, lo cual corresponde con los resultados obtenidos por Vásquez, 2015 (53) quien obtuvo su mayor densidad celular al séptimo día de evaluación. Referente al perfil de crecimiento de *Chlorella sp.* se observó una densidad celular inicial similar en todas las condiciones, la fase de acondicionamiento se alcanzó al día 1, en el grupo control se observó una fase estacionaria hasta el día tres, alcanzando su mayor densidad celular al sexto día; además observamos que el tratamiento de 4 minutos presentó diferencias altamente significativas al quinto día de exposición con respecto a los otros tratamientos, esto es consistente con lo encontrado por Pérez, 2015(52) quien observó una fase de acondicionamiento de un día a partir del cual se da un crecimiento progresivo y la fase exponencial al sexto día. Esto se sustenta con lo afirmado por Arredondo y Vásquez, 1991(16) quienes indicaron que cada especie de microalga responde de manera diferente ante la disponibilidad de nutrientes y dependiendo de su procedencia. Así mismo, Urcia y Díaz, 2014(55) indican que el perfil de crecimiento de las microalgas puede ser alterado sustancialmente por la manipulación de las condiciones de cultivo. Es por este motivo que es de suma importancia analizar el efecto del CO₂ en el cultivo de microalgas, ya que cada cepa tiene una respuesta diferente. Por lo tanto la concentración o tiempo de exposición al CO₂ aplicado en un medio de cultivo dependerá de cada especie, por ello que se recomienda continuar con estudios relacionados a la exposición de CO₂ en combinación con otros métodos de cultivo tales como la utilización de lixiviados, aguas residuales o diferentes intensidades de luz que puedan inducir a una mejor producción de biomasa y acumulación de lípidos totales para futuras aplicaciones.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

- La especie microalgal que mostró la mayor tasa de crecimiento fue *Chlorella sp.* en el grupo control (0.18 d^{-1}).
- La especie microalgal que mostró la mayor producción de biomasa fue *Scenedesmus sp.* a los 8 minutos de exposición al CO_2 (901.63 mg/L).
- La especie microalgal que mostró la mayor producción de lípidos totales fue *Chlorella sp.* a los 6 minutos de exposición al CO_2 (47.60%).
- Dos de las especies de microalgas oleaginosas amazónicas evaluadas mostraron un aumento significativo en la producción de biomasa en los tratamientos 2 y 3, *Scenedesmus sp* y *Scenedesmus quadricauda* a los 8 y 6 minutos de exposición al CO_2 respectivamente.
- En la acumulación de lípidos totales, se encontró que tres de las cuatro especies evaluadas, tuvieron un aumento en la producción de lípidos, sin embargo fue la especie *Chlorella sp* a los 6 minutos de exposición al CO_2 la que mostró mayor contenido lipídico, mostrándose esta especie y este tratamiento ideal para una buena producción de lípidos .
- Las especies evaluadas mostraron un aumento en la producción de biomasa y acumulación de lípidos totales en los tratamientos 2 y 3 (6 y 8 minutos de exposición al CO_2), aunque no se obtuvo una especie en específico que produjera al mismo tiempo mayor biomasa y lípidos totales.

CAPÍTULO VIII

RECOMENDACIONES

Los resultados de la presente tesis se dieron a los 7 días de evaluación, sin embargo al no observar en la curva de crecimiento una fase de muerte, es posible que si se amplía el tiempo de evaluaciones se pueda obtener mejores resultados.

Cabe la posibilidad que los valores obtenidos sometiendo a diferentes tiempos de exposición al CO₂ se incremente en combinación con otro elemento.

Modificar otros parámetros a fin de mejorar la producción de biomasa y lípidos totales.

Es importante que los cultivos sean unialgales para así garantizar resultados de buena calidad y evitar la competencia entre microorganismos.

Se debe cumplir y tener en consideración los principios de bioseguridad antes, durante y después de manipular reactivos, material biológico u otras sustancias químicas peligrosas, al momento de ejecutar los bioensayos en el laboratorio.

CAPÍTULO IX

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Julia Martinez, Adrian Fernandez Bremauntz. Cambio climático una visión desde México [Internet]. Primera edición. Mexico; 2004. Available from: http://awsassets.panda.org/downloads/cambio_climatico_una_vision_desde_mexico_martinez_bremauntz.pdf
2. Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 2011 Mar;26(3):126–31.
3. Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv.* 2007 Jun;25(3):294–306.
4. Stocker Thomas F, Gian Kasper Plattner, Dahe Qin. Cambio Climatico 2013 bases físicas [Internet]. 2013 Oct. Available from: www.climatechange2013.org
5. Wang B, Li Y, Wu N, Lan CQ. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008 Jul;79(5):707–18.
6. Vieira Costa J. A. Producción de biodiesel a partir de microalgas. 2004;ISBN N° 987.
7. Sheehan J, Dunahay T, Benemann R, Roessler G. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae [Internet]. National Renewable Energy Laboratory; 1998 Jul. Available from: http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/biodiesel_from_algae.pdf
8. Fernández Linares LC, Montiel Montoya J, Millán Oropeza A, Badillo Corona JA. PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES A PARTIR DE MICROALGAS. 2012 Sep;vol. 8. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46125177011>
9. Sheehan L. Are biofuel sustainable. *Natl Renew Energy Lab.* 2006;
10. Demirbas, A. Energy Sources Part A. Recovery Utilization en Environmental Effects. 2010;
11. Dote Y, Sawayama S, Inoue S, Minowa T, Yokoyama S. Recovery of liquid fuel from hydrocarbon-rich microalgae by thermochemical liquefaction. *Fuel.* 1994 Dec;73(12):1855–7.
12. Miao X, Wu Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour Technol.* 2006 Apr;97(6):841–6.
13. Minowa T, Yokoyama S, Kishimoto M, Okakura T. Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction. *Fuel.* 1995 Dec;74(12):1735–8.
14. Garibay A, Vazquez R, Sanchez M, Serrano L, Martínez A. Biodiesel a partir de microalgas. *Biocnología.* 2009;13 (3):38 – 61.
15. Albarracín I. La producción de biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad. In 2007. p. 1– 16.

16. Arredondo-Vega, B.O, Vázquez-Duhalt, R. Aplicaciones biotecnológicas del cultivo de microalgas. *Cienc Desarro* Xvii 98 99-111. 1991;
17. Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J Cell Mol Biol*. 2008 May;54(4):621–39.
18. Canell R. J. P. Algae as a Source of Biologically Active Products. *Pestic Sci*. 1993;39: 147–153.
19. Demirbas A, Demirbas MF. *Algae Energy: Algae as a New Source of Biodiesel*. Springer; 2010. 204 p.
20. Amaro HM, Guedes AC, Malcata FX. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Appl Energy*. 2011 Oct;88(10):3402–10.
21. Mutanda T, Ramesh D, Karthikeyan S, Kumari S, Anandraj A, Bux F. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresour Technol*. 2011 Jan;102(1):57–70.
22. Illman AM, Scragg AH, Shales SW. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb Technol*. 2000;
23. William Robert Capa Robles. *Biología y Biotecnología de microalgas*. primera edición. CONCYTEC; 2010.
24. *La energía de las algas. Presente y Futuro*. Plataforma Tecnológica Española Biomasa. 2006;
25. Badui Dergal S. *Química de los alimentos*. Alhambra Mexicana, Editorial, S.A. de C.V.; 1993. 652 p.
26. Courchesne M, Parisien A, Wang B, Lan Q. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *J Biotechnol*. 2009;(141(1-2)):31–41.
27. Cao, Z, Gao, Liu , M, Jiao, P. Engineering the ecetyl-CoA transportation system of candida tropicalis enhances the production of dicarboxylic acid. *Biotechnol J*. 2006;(1 (1)):68–74.
28. Subrahmanyam, S, Cronan Jr. J.E. Overproduction of a functional fatty acid biosynthetic enzyme blockme fatty acid synthesis in *Escherichia coli*. *Jounal Bacteriol*. 1998;(180 (17)):4596–602.
29. Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock: *Biología de los microorganismos*. 8^a ed. Madrid: Prentice Hall; 1999.
30. Guschina IA, Harwood JL. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res*. 2006 Mar;45(2):160–86.
31. Beer LL, Boyd ES, Peters JW, Posewitz MC. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Curr Opin Biotechnol*. 2009 Jun;20(3):264–71.
32. Stephanopoulos G, Fischer C, Klein D. Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metab Eng*. 2008;10(6):295- 304.

33. Scott SA, Davey MP, Dennis JS, Horst I, Howe CJ, Lea-Smith DJ, et al. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Curr Opin Biotechnol.* 2010 Jun;21(3):277–86.
34. Rajakumari S, Grillitsch K, Daum G. Synthesis and turnover of non-polar lipids in yeast. *Prog Lipid Res.* 2008 May;47(3):157–71.
35. Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res.* 2001 Sep;40(5):325–438.
36. Lee JS, Sung KD, Kim MS, Park SC, Lee KW. Current aspects of carbon dioxide fixation by microalgae in Korea. Korea: Symposium on the capture, utilization and disposal of CO₂.; 1996.
37. Doucha J, Straka F, Livansky K. Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *J Appl Phycol*; 2005.
38. Benemann, J.R. Biological utilization of CO₂ – A review. Prepared for MIT White Paper. Unpublished. 1992;
39. Ota M, Kato Y, Watanabe H, Watanabe M, Sato Y, Smith RL Jr, et al. Fatty acid production from a highly CO₂ tolerant alga, *Chlorococcum littorale*, in the presence of inorganic carbon and nitrate. *Bioresour Technol.* 2009 Nov;100(21):5237–42.
40. De Morais MG, Costa JAV. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnol Lett.* 2007 Sep;29(9):1349–52.
41. Tsuzuki M, Ohnuma E, Sato N, Takaku T, Kawaguchi A. Effects of CO₂ Concentration during Growth on Fatty Acid Composition in Microalgae 1. *Plant Physiol.* 1990 Jul;93(3):851–6.
42. Widjaja A, Chien CC, Ju YH. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *J Taiwan Inst Chem Eng.* 2009;
43. Chiu SY, Kao CY, Tsai MT, Ong SC, Chen CH, Lin CS. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresour Technol.* 2009;
44. Rosenberg JN, Oyler GA, Wilkinson L, Betenbaugh MJ. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr Opin Biotechnol.* 2008 Oct;19(5):430–6.
45. Barclay W, Jhonsen J, Chelf P, Nagle N, Roessler R. Microalgae culture collection, 1986-1987 [Internet]. 1986 [cited 2014 Apr 3]. Available from: <http://www.oilgae.com/blog/2007/02/series-microalgae-culture-collection-1986.html>
46. Yu X, Zhao P, He C, Li C, Huang Z, Zhou J. Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. *Bioresour Technol.*; 2012.
47. Spolaore P, Joannis C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng.* 2006;101(2):87–96.

48. Schenk PM, Thomas-Hall SR, Stephens E, Marx UC, Mussnug JH, Posten C, et al. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *Bioenergy Res.* 2008 Mar 1;1(1):20-43.
49. Catalina QUEVEDO O, Sonia P. MORALES V., Alejandro ACOSTA C. CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* sp EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE PROTEINA MICROALGAL. *Vitae Rev Fac Quím Farm.* 2008;15:25-31.
50. Kim MK, Park JW, Park CS, Kim SJ, Jeune KH, Chang MU. Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. *Bioresour Technol.* 2007;98:2220-8.
51. Greque M, Vieira JÁ. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *J Biotechnol.* 2007;129:439-45.
52. Sheyla Lenit Perez Gallardo. Evaluacion de la remoción de contaminantes en lixiviado empleando tres especies de microalgas amazónicas [Pre-grado]. [Iquitos-Perú]: Universidad Científica del Perú; 2015.
53. Oscar Enrique Vasquez García. Efecto de la intensidad luminosa en la producción de biomasa microalgal y acumulación de lípidos totales en cuatro especies de microalgas oleaginosas amazónicas. [Tesis de pre-grado]. [Iquitos-Perú]: Universidad Científica del Perú; 2015.
54. Jae Diana Paredes Rodríguez. Impacto de la eliminación de nitrógeno en la acumulación de lípidos totales en cinco especies de microalgas oleaginosas. [Tesis de pre-grado]. [Iquitos-Perú]: Universidad Científica del Perú; 2014.
55. Diaz Calampa Lilia Vanessa, Urcia Saboya Margarita Alheli. Aislamiento e identificación de microalgas oleaginosas en las cuencas de los ríos Amazonas, Itaya y Nanay, Loreto- 2013 [Tesis de pre-grado]. [Iquitos-Perú]: Universidad Científica del Perú; 2014.
56. Marianela Cobos R., Juan C. Castro G., Javier Del Águila C., Herminio Soplín B. Identificación de microalgas oleaginosas en el área de concesión para conservación, cuenca alta del río itaya. Loreto-perú. *Ciencia Amazónica*, 2012, Vol. 2, No. 2, 162-168

ANEXOS

Tabla 04. Comparaciones entre las variables de biomasa mediante la prueba estadística ANOVA.

	Descriptivos							
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
.00	3	13,3333	,57735	,33333	11,8991	14,7676	13,00	14,00
1,00	3	14,3333	,57735	,33333	12,8991	15,7676	14,00	15,00
2,00	3	19,3333	,57735	,33333	17,8991	20,7676	19,00	20,00
3,00	3	90,0000	63,83573	36,85557	-68,5767	248,5767	20,00	145,00
Total	12	34,2500	43,32357	12,50644	6,7235	61,7765	13,00	145,00
.00	3	11,0000	5,00000	2,88675	-1,4207	23,4207	6,00	16,00
1,00	3	14,3333	1,52753	,88192	10,5388	18,1279	13,00	16,00
2,00	3	44,6667	46,19885	26,67292	-70,0976	159,4310	17,00	98,00
3,00	3	16,0000	1,00000	,57735	13,5159	18,4841	15,00	17,00
Total	12	21,5000	24,32918	7,02323	6,0420	36,9580	6,00	98,00
.00	3	17,3333	1,15470	,66667	14,4649	20,2018	16,00	18,00
1,00	3	16,6667	1,15470	,66667	13,7982	19,5351	16,00	18,00
2,00	3	10,6667	1,15470	,66667	7,7982	13,5351	10,00	12,00
3,00	3	13,3333	2,08167	1,20185	8,1622	18,5045	11,00	15,00
Total	12	14,5000	3,06001	,88335	12,5558	16,4442	10,00	18,00
.00	3	11,0000	1,00000	,57735	8,5159	13,4841	10,00	12,00
1,00	3	12,3333	,57735	,33333	10,8991	13,7676	12,00	13,00
2,00	3	10,3333	2,30940	1,33333	4,5965	16,0702	9,00	13,00
3,00	3	13,0000	1,73205	1,00000	8,6973	17,3027	12,00	15,00
Total	12	11,6667	1,72328	,49747	10,5717	12,7616	9,00	15,00

Tabla 05. Comparaciones entre las variables de lípidos mediante la prueba estadística ANOVA.

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
,00	3	20,8000	1,40000	,80829	17,3222	24,2778	19,20	21,80
1,00	3	20,0667	,11547	,06667	19,7798	20,3535	20,00	20,20
ScspLipido	3	19,9333	1,47422	,85114	16,2712	23,5955	18,80	21,60
3,00	3	18,0000	2,22711	1,28582	12,4676	23,5324	15,60	20,00
Total	12	19,7000	1,68091	,48524	18,6320	20,7680	15,60	21,80
,00	3	10,0000	1,05830	,61101	7,3710	12,6290	8,80	10,80
1,00	3	12,5333	2,64071	1,52461	5,9735	19,0932	10,20	15,40
ScOlipido	3	12,5333	5,27763	3,04704	-,5770	25,6437	9,00	18,60
3,00	3	12,2667	,46188	,26667	11,1193	13,4140	12,00	12,80
Total	12	11,8333	2,79458	,80673	10,0577	13,6089	8,80	18,60
,00	3	20,9333	2,05264	1,18509	15,8343	26,0324	19,20	23,20
1,00	3	23,4000	5,57494	3,21870	9,5511	37,2489	19,60	29,80
ChispLipido	3	47,6000	15,95494	9,21159	7,9657	87,2343	29,20	57,60
3,00	3	36,0667	8,40079	4,85020	15,1979	56,9354	26,40	41,60
Total	12	32,0000	13,78352	3,97896	23,2424	40,7576	19,20	57,60
,00	3	23,9333	11,47229	6,62353	-4,5654	52,4321	10,80	32,00
1,00	3	28,6667	1,70098	,98206	24,4412	32,8921	27,00	30,40
AnknLipido	3	27,7333	1,79258	1,03494	23,2803	32,1863	26,60	29,80
3,00	3	26,4000	,91652	,52915	24,1233	28,6767	25,40	27,20
Total	12	26,6833	5,35263	1,54517	23,2824	30,0842	10,80	32,00

Tabla 06. Comparaciones entre las variables de biomasa mediante la prueba de post hoc.

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

Variable dependiente	(I) Factor	(J) Factor	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
						Límite inferior	Límite superior	
ScspBiomasa	,00	1,00	-1,00000	26,06402	1,000	-84,4662	82,4662	
		2,00	-6,00000	26,06402	,995	-89,4662	77,4662	
		3,00	-76,66667	26,06402	,072	-160,1328	6,7995	
	1,00	,00	1,00000	26,06402	1,000	-82,4662	84,4662	
		2,00	-5,00000	26,06402	,997	-88,4662	78,4662	
		3,00	-75,66667	26,06402	,076	-159,1328	7,7995	
	2,00	,00	6,00000	26,06402	,995	-77,4662	89,4662	
		1,00	5,00000	26,06402	,997	-78,4662	88,4662	
		3,00	-70,66667	26,06402	,100	-154,1328	12,7995	
	ScQbiomasa	,00	,00	76,66667	26,06402	,072	-6,7995	160,1328
			1,00	75,66667	26,06402	,076	-7,7995	159,1328
			2,00	70,66667	26,06402	,100	-12,7995	154,1328
1,00		1,00	-3,33333	18,98537	,998	-64,1312	57,4645	
		2,00	-33,66667	18,98537	,351	-94,4645	27,1312	
		3,00	-5,00000	18,98537	,993	-65,7979	55,7979	
2,00		,00	3,33333	18,98537	,998	-57,4645	64,1312	
		1,00	-30,33333	18,98537	,431	-91,1312	30,4645	
		3,00	-1,66667	18,98537	1,000	-62,4645	59,1312	
3,00		,00	33,66667	18,98537	,351	-27,1312	94,4645	
		1,00	30,33333	18,98537	,431	-30,4645	91,1312	
		3,00	28,66667	18,98537	,475	-32,1312	89,4645	
ChlspBiomasa	,00	,00	5,00000	18,98537	,993	-55,7979	65,7979	
		1,00	1,66667	18,98537	1,000	-59,1312	62,4645	
		2,00	-28,66667	18,98537	,475	-89,4645	32,1312	
	1,00	1,00	,66667	1,17851	,940	-3,1073	4,4407	
		2,00	6,66667	1,17851	,002	2,8927	10,4407	
		3,00	4,00000	1,17851	,038	,2260	7,7740	
	2,00	,00	-,66667	1,17851	,940	-4,4407	3,1073	
		1,00	6,00000	1,17851	,004	2,2260	9,7740	
		3,00	3,33333	1,17851	,085	-,4407	7,1073	
	3,00	,00	-6,66667	1,17851	,002	-10,4407	-2,8927	
		1,00	-6,00000	1,17851	,004	-9,7740	-2,2260	
		3,00	-2,66667	1,17851	,186	-6,4407	1,1073	

		,00	-4,00000	1,17851	,038	-7,7740	-2,260
	3,00	1,00	-3,33333	1,17851	,085	-7,1073	,4407
		2,00	2,66667	1,17851	,186	-1,1073	6,4407
		1,00	-1,33333	1,26930	,727	-5,3981	2,7314
	,00	2,00	,66667	1,26930	,951	-3,3981	4,7314
		3,00	-2,00000	1,26930	,442	-6,0647	2,0647
		,00	1,33333	1,26930	,727	-2,7314	5,3981
	1,00	2,00	2,00000	1,26930	,442	-2,0647	6,0647
		3,00	-,66667	1,26930	,951	-4,7314	3,3981
AnknBiomasa		,00	-,66667	1,26930	,951	-4,7314	3,3981
	2,00	1,00	-2,00000	1,26930	,442	-6,0647	2,0647
		3,00	-2,66667	1,26930	,231	-6,7314	1,3981
		,00	2,00000	1,26930	,442	-2,0647	6,0647
	3,00	1,00	,66667	1,26930	,951	-3,3981	4,7314
		2,00	2,66667	1,26930	,231	-1,3981	6,7314

La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tabla 07. Comparaciones entre las variables de lípidos mediante la prueba de post hoc.

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

Variable dependiente	(I) Factor	(J) Factor	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
ScspLipido		1,00	,73333	1,23198	,931	-3,2119	4,6786
	,00	2,00	,86667	1,23198	,893	-3,0786	4,8119
		3,00	2,80000	1,23198	,184	-1,1452	6,7452
		,00	-,73333	1,23198	,931	-4,6786	3,2119
	1,00	2,00	,13333	1,23198	1,000	-3,8119	4,0786
		3,00	2,06667	1,23198	,393	-1,8786	6,0119
		,00	-,86667	1,23198	,893	-4,8119	3,0786
	2,00	1,00	-,13333	1,23198	1,000	-4,0786	3,8119
		3,00	1,93333	1,23198	,445	-2,0119	5,8786
		,00	-2,80000	1,23198	,184	-6,7452	1,1452
	3,00	1,00	-2,06667	1,23198	,393	-6,0119	1,8786
		2,00	-1,93333	1,23198	,445	-5,8786	2,0119
ScQLipido		1,00	-2,53333	2,45493	,737	-10,3949	5,3282
	,00	2,00	-2,53333	2,45493	,737	-10,3949	5,3282
		3,00	-2,26667	2,45493	,794	-10,1282	5,5949

		,00	2,53333	2,45493	,737	-5,3282	10,3949
	1,00	2,00	,00000	2,45493	1,000	-7,8615	7,8615
		3,00	,26667	2,45493	1,000	-7,5949	8,1282
		,00	2,53333	2,45493	,737	-5,3282	10,3949
	2,00	1,00	,00000	2,45493	1,000	-7,8615	7,8615
		3,00	,26667	2,45493	1,000	-7,5949	8,1282
		,00	2,26667	2,45493	,794	-5,5949	10,1282
	3,00	1,00	-,26667	2,45493	1,000	-8,1282	7,5949
		2,00	-,26667	2,45493	1,000	-8,1282	7,5949
		1,00	-,246667	7,75056	,988	-27,2867	22,3533
	,00	2,00	-26,66667	7,75056	,036	-51,4867	-1,8467
		3,00	-15,13333	7,75056	,281	-39,9533	9,6867
		,00	2,46667	7,75056	,988	-22,3533	27,2867
	1,00	2,00	-24,20000	7,75056	,056	-49,0200	,6200
		3,00	-12,66667	7,75056	,413	-37,4867	12,1533
		,00	26,66667	7,75056	,036	1,8467	51,4867
	2,00	1,00	24,20000	7,75056	,056	-,6200	49,0200
		3,00	11,53333	7,75056	,486	-13,2867	36,3533
		,00	15,13333	7,75056	,281	-9,6867	39,9533
	3,00	1,00	12,66667	7,75056	,413	-12,1533	37,4867
		2,00	-11,53333	7,75056	,486	-36,3533	13,2867
		1,00	-4,73333	4,80555	,762	-20,1224	10,6557
	,00	2,00	-3,80000	4,80555	,857	-19,1891	11,5891
		3,00	-2,46667	4,80555	,954	-17,8557	12,9224
		,00	4,73333	4,80555	,762	-10,6557	20,1224
	1,00	2,00	,93333	4,80555	,997	-14,4557	16,3224
		3,00	2,26667	4,80555	,963	-13,1224	17,6557
		,00	3,80000	4,80555	,857	-11,5891	19,1891
	2,00	1,00	-,93333	4,80555	,997	-16,3224	14,4557
		3,00	1,33333	4,80555	,992	-14,0557	16,7224
		,00	2,46667	4,80555	,954	-12,9224	17,8557
	3,00	1,00	-2,26667	4,80555	,963	-17,6557	13,1224
		2,00	-1,33333	4,80555	,992	-16,7224	14,0557

La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tabla 08. Composición del medio CHU10

Componentes	Concentración (g/1000ml H ₂ O)
Macronutrientes	
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,67
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,69
NaHCO ₃	1,26
K ₂ HPO ₄	0,87
NaNO ₃	8,50
Solución Citrato férrico:	
Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇)	3,35
Citrato férrico (C ₆ H ₅ FeO ₇ *Xh ₂ O)	3,35
Micronutrientes	(mg/ 1000ml H₂O)
NaEDTA	50,0
H ₃ BO ₃	618,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	19,6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	44,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	20,0
MnCl ₂ .4H ₂ O	12,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	12,6
Solución Silicato:	
Metasilicato de sodio (Na ₂ SiO ₃)	
Acido clorhídrico (HCl)	

Figura 10. Cultivos iniciales de las cuatro especies de microalgas amazónicas.



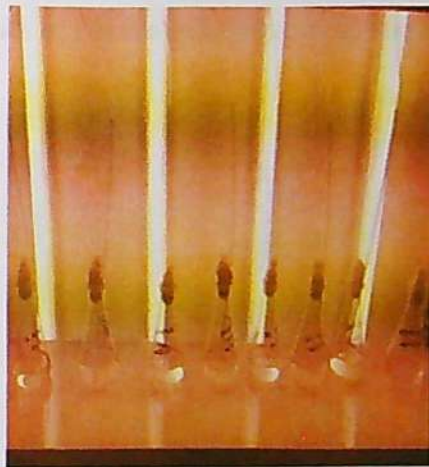
Stock de reactivos para la preparación del medio de cultivo CHU10.



Materiales para la preparación del medio CHU10 Para el cultivo inicial.



Medio CHU10 Para el cultivo inicial.



Cultivos iniciales.

Figura 11. Cosecha microalgal para ensayos.



Cosecha microalgal en tubos de 15ml.



Centrifugación del cultivo microalgal en tubos de 15ml.



Biomasa obtenida de la cosecha microalgal

Figura 12. Ensayos de cuatro especies de microalgas amazónicas sometidas a diferentes tiempos de exposición de CO₂.



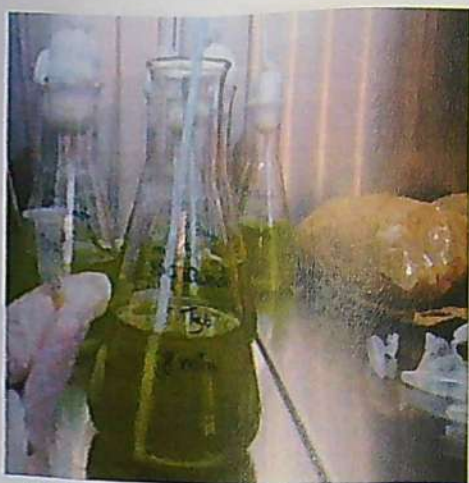
Preparación de medio de cultivo para los ensayos.



Medio de Cultivo CHU10 para los ensayos.



Inserción de la biomasa para los ensayos



Alícuota de los ensayos antes de someterlos al CO₂.



Microalgas sometidas a diferentes tiempos de exposición al CO₂.

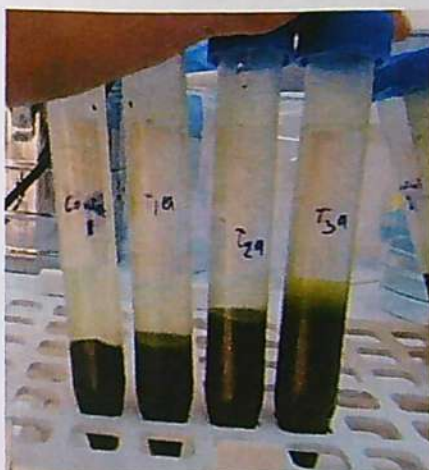


Cultivos de los ensayos instalados en las condiciones correspondientes.

Figura 13. Cosecha de las microalgas sometidas a tratamiento. (Secado, raspado y pesado)



Centrifugación para la cosecha de los cultivos de ensayos.



Biomasa obtenida de la cosecha de los ensayos.



Biomasa en placas Petri para el secado.



Biomasa Seca raspada.

Figura 14. Extracción de lípidos totales de las cuatro especies microalgales sometidas a diferentes tiempos de exposición de CO₂



Trituración de la biomasa con la solución extractora cloroformo:metanol.



Biomasa triturada en tubos de 2ml para su centrifugación.



Fase clorofórmica posterior a su centrifugación.



Contenido lipídico (fase clorofórmica) a 4, 6 y 8 minutos de exposición al CO₂. En vasos precipitados con peso conocido.