

UNIVERSIDAD CIENTIFICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE ECOLOGIA



EFFECTO DE LA INTENSIDAD LUMINOSA EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL Y ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES EN CUATRO ESPECIES DE MICROALGAS OLEAGINOSAS AMAZONICAS

Presentado por:

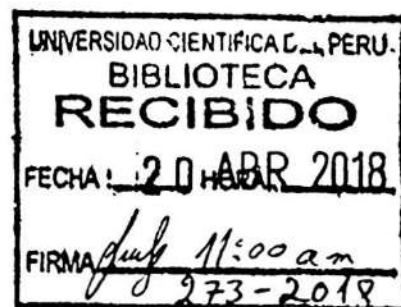
OSCAR ENRIQUE VASQUEZ GARCIA

Tesis para optar el Título Profesional de:

LICENCIADO EN ECOLOGIA

SAN JUAN-PERÚ

2015



DEDICATORIA

A Dios todopoderoso por su inmensurable amor, brindándome bendición, protección, fortaleza y guiarme en cada momento de mi vida permitiéndome concluir el camino con éxito.

A mis amigos que siempre están apoyándome y aconsejándome

A mis Padres, Rosa y Gabriel por brindarme todo su apoyo, confianza, buenas enseñanzas incondicionalmente y sobre todo su gran paciencia durante esta etapa de mí.

A mis hermanos Rosa y Marcos por estar siempre a mi lado en las buenas y malas.

A Victoria Regia por ser parte importante en mi vida, por brindarme felicidad, tranquilidad, paz y darme motivaciones para hacer las cosas bien.

Oscar Enrique Vásquez García

AGRADECIMIENTO

Al proyecto de investigación “creación de un banco de cepas de microalgas oleaginosas con potencial aplicación para la producción sustentable de biodiesel en la amazonia peruana” subvencionado por la Universidad Científica del Perú (UCP) por el apoyo financiero brindado para la realización de la presente tesis.

Al Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú y a la Unidad Especializada de Biotecnología por el acceso al uso de reactivos y equipos.


A la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonia (CIRNA-UNAP), por permitirme el uso de sus equipos, materiales y reactivos.

A mi asesora Dra. Marianela Cobos Ruiz por bríndame la oportunidad de realizar la tesis a través del proyecto mencionado líneas arriba y a su vez por depositar su confianza en mí, también agradecer por el apoyo académico y motivación en todo momento; antes, durante y después de la ejecución de la tesis para así poder concluirlo.

Al Dr. Juan Carlos Castro Gómez por las enseñanzas y la paciencia brindada en el desarrollo de la tesis y datos estadísticos.


A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron a la culminación de la tesis, a todas ellas **MUCHAS GRACIAS**.

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



Ing. Ulises Octavio Ingoín Cabrera MSc.

PRESIDENTE



Dr. Juan Carlos Castro Gómez

MIEMBRO



Dr. Jorge Luis Marapara Del Águila

MIEMBRO



Dra. Mariana Cobos Ruíz

ASESORA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Iquitos, a las 10:00 horas del día martes 21 de julio del año 2015, se reunió el Jurado Examinador, que firma al final del presente documento, para evaluar la Sustentación del bachiller en Ecología:

OSCAR ENRIQUE VASQUEZ GARCÍA

En la modalidad de: **SUSTENTACIÓN DE TESIS**

"Efecto de la intensidad luminosa en la producción de biomasa microalgal y acumulación de lípidos totales en cuatro especies de microalgas oleaginosas amazónicas"

Después de las deliberaciones correspondientes, se procedió a evaluar:

Indicador	Examinador 1	Examinador 2	Examinador 3	Promedio
A) Dominio del Tema	16	15	15	15
B) Calidad de Redacción de la Tesis	17	17	17	17
C) Competencia Expositiva (Claridad conceptual, argumentación y coherencia)	15	15	14	15
D) Calidad de Respuestas	16	17	17	17
E) Uso de Terminología Especializada	16	16	17	16
Calificación Final:				16

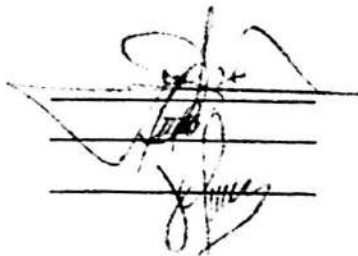
Aprobado Por: UNANIMIDAD

Calificación Final (en letras): DIECISEIS

Presidente: Ing. Ulises Octavio Irigoin Cabrera

Miembro: Dr. Juan Carlos Castro Gómez

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 Vive en Ti

Av. Abelardo Quiñones Km. 2.5 San Juan Bautista, Iquitos Telf.: (065) 261088-261092

CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTO	3
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR	4
ÍNDICE DE TABLA	7
INDICE DE FIGURA	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
CAPÍTULO I	
Introducción	11
CAPÍTULO II	
Objetivos	13
CAPÍTULO III	
Marco teórico	14
3.1. Antecedentes.	14
3.2. Bases teóricas	16
3.2.1. Generalidades	16
3.3. Factores que influyen sobre el cultivo	16
3.7. Lípidos	20
3.8. Microalgas oleaginosas	21
3.9. Definición de términos básicos	22
CAPÍTULO IV	
Materiales y Métodos	24
4.1. Lugar y desarrollo de la investigación	24
4.2. Recursos utilizados	24
4.2.1. Materiales	24

4.2.2. Equipos	25
4.2.3. Reactivos	25
4.2.4. Programas	26
4.3. Aspecto metodológico	26
4.4. Muestra	27
4.5. Técnicas, instrumentos y procedimientos de recolección de datos	27
4.5.1. Técnicas de recolección de datos	27
4.5.2. Instrumento de recolección de datos	28
4.5.3. Procedimiento experimental	28
4.5.3.1. Cultivo inicial y cosecha microalgal	28
4.5.3.2. Evaluación de los ensayos con intensidad luminosa y temperatura	28
4.5.3.3. Cosecha de la biomasa microalgal	29
4.5.3.4. Extracción y análisis de lípidos totales	29
4.6. Análisis de datos	30
CAPÍTULO V	
Resultados	31
CAPÍTULO VI	
Discusión	36
CAPÍTULO VII	
Conclusiones	38
CAPÍTULO VIII	
Recomendaciones	39
CAPÍTULO IX	
Referencias Bibliográficas	40

ÍNDICE DE TABLAS

N°	Título	Pág.
01	tasa de crecimiento (μ) de cuatro especies microalgales oleaginosas cultivadas en diferentes condiciones de intensidad luminosa	31

INDICE DE FIGURAS

N°	Título	Pág.
01.	Clasificación de lípidos	20
02.	Flujograma de inducción de lípidos en cuatro microalgas oleaginosas	27
03.	Perfil de crecimiento de cuatro especies de microalgas oleaginosas amazónicas cultivadas en diferentes condiciones de intensidades luminosas	32
04.	Biomasa en peso seco(mg/L) y contenido de lípidos totales(%) de cuatro especies de microalgas oleaginosas cultivadas en medio CHU10 a diferentes intensidades luminosas	35

RESUMEN

Las microalgas son organismos microscópicos capaces de convertir la energía solar en biomasa con una eficiencia de 2 a 5 veces mayor que las plantas superiores. Asimismo, la intensidad luminosa juega un papel fundamental sobre la capacidad fotosintética, densidad celular y producción de lípidos. El objetivo del estudio fue determinar el efecto de la intensidad luminosa en la tasa de crecimiento, producción de biomasa y acumulación de lípidos totales de las microalgas oleaginosas amazónicas (*Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp. *Scenedesmus quadricauda* y *Scenedesmus* sp.). Las microalgas fueron cultivadas por triplicado en medio CHU10, bajo tres condiciones de intensidad luminosa y un grupo control. Los cultivos fueron evaluados por siete días. Se hizo el conteo diario de las células mediante microscopia usando una cámara de Neubauer. La biomasa microalgal se obtuvo por centrifugación y el contenido de lípidos totales se determinó por gravimetría. Los resultados de la mayor tasa de crecimiento lo obtuvo *Scenedesmus* sp. ($0,55 \text{ día}^{-1}$) al ser cultivada con intensidad luminosa de $73 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, Además *Scenedesmus* sp. mostró una alta producción de biomasa de $175,40 \text{ mg/L}$ y mayor porcentaje de lípidos totales (22 %); mientras que *Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp, y *Scenedesmus quadricauda* mostraron producción de biomasa de 102 mg/L , 120 mg/L y 110 mg/L respectivamente en la intensidad luminosa de $121 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$. Sin embargo, no se encontró diferencias significativas entre las intensidades luminosas cultivadas ($p > 0,05$). En conclusión, *Scenedesmus* sp, obtuvo una producción de biomasa, contenido lipídico y tasa de crecimiento óptimo al ser cultivada con una intensidad luminosa de $73 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$.

Palabras clave: microalgas amazónicas, capacidad fotosintética, intensidad luminosa

ABSTRACT

Microalgae are microscopic organisms capable of converting solar energy into biomass with an efficiency of 2-5 times greater than the upper floors. Also, light intensity plays an important role on the photosynthetic capacity, cell density and lipids production. The aim of the study was to determine the effect of light intensity on the growth rate, biomass production and accumulation of total lipids from microalgae Amazon (*Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp. *Scenedesmus quadricauda* and *Scenedesmus* sp.). The microalgae were cultured in triplicate in the medium CHU10 under three conditions of light intensity and a control group. Cultures were tested for seven days. Daily cell count was done by microscopy using a Neubauer. Microalgal biomass was obtained by centrifugation and the total lipid content was determined gravimetrically. The results of the highest growth rate was obtained by *Scenedesmus* sp. (0.55 day⁻¹) when grown with light intensity of 73 $\mu\text{E.m}^2.\text{s}^{-1}$, addition *Scenedesmus* sp. showed high biomass production of 175.40 mg / L and increased total lipid (22%); while *Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp, and *Scenedesmus quadricauda* biomass production showed 102 mg/L, 120 mg/L and 110 mg/L respectively in light intensity of 121 $\mu\text{E.m}^2.\text{s}^{-1}$. However, no significant differences between cultivated light intensities ($p > 0.05$). In conclusion, *Scenedesmus* sp, obtained a biomass production, lipid content and optimal growth rate when grown with a light intensity of 73 $\mu\text{E.m}^2.\text{s}^{-1}$.

Keywords: Amazon microalgae, photosynthetic capacity, light intensity.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Debido a la condición actual de agotamiento de los combustibles fósiles, incremento de los precios del petróleo y calentamiento global como consecuencia de la acumulación de gases de efecto invernadero, el panorama para la producción de bioenergía a partir de microalgas es alentador (1-5). Las microalgas se caracterizan por acumular triglicéridos debido a su capacidad fotosintética (por encima del 77% de su peso seco), pueden secuestrar carbono de fuentes industriales y demandan menos área que los cultivos tradicionales (2, 6,7). El contenido total de los lípidos en las microalgas puede variar desde 1 hasta 90% del peso seco, dependiendo de la especie y de la condiciones del cultivo (6,8).

Asimismo, las microalgas son organismos microscópicos que poseen una maquinaria fotosintética capaz de convertir la energía solar en biomasa con una eficiencia de 2 a 5 veces mayor que las plantas superiores (9). Sus elevadas productividades lipídicas son deseables para la elaboración de biodiesel, razón por la cual la cantidad de lípidos contenidos en la biomasa y la velocidad de crecimiento, sumados a la eficiencia metabólica y la robustez del microorganismo, son parámetros relevantes para su selección (6, 7). En este sentido, el sistema de cultivo microalgal debe poseer ciertas condiciones ambientales para un mejor resultado en la producción de biomasa. Entre estas, el medio de cultivo debe ser rico en nutrientes, luz óptima y temperatura adecuada (10). Siendo, los parámetros más importantes que regulan el crecimiento de las algas la, cantidad y calidad de nutrientes, intensidad de luz, pH, turbulencia, salinidad y temperatura (11).

Considerando lo publicado por Torzillo (12), al realizar un cálculo del rendimiento de la biomasa y de los lípidos para una microalga, en un cultivo de *Nannochloropsis* en condiciones a la intemperie, quienes hallaron una productividad superficial máxima de biomasa de 5,8 g/m².d y un contenido de lípidos de 43,4 % reportado por Martínez (13) en condiciones de estrés por salinidad.

La biomasa puede ser usada para diferentes aplicaciones, como son: alimento para animales, producción de biodiesel, biofertilizantes, condicionador del suelo, alimento de los

acuarios o puede ayudar a resolver problemas de salud pública, por medio de la purificación biológica de las aguas negras de las ciudades (14-16). Además, se han considerado diferentes especies de *Chlorella* y *Scenedesmus* como candidatos para la producción comercial de lípidos debido a su rápido crecimiento y fácil cultivo (17). Las microalgas bajo condiciones normales de cultivo presentan un contenido de lípidos que por lo general varía entre el 20 y el 50 % de su peso seco, sin embargo cuando son sometidas a situaciones de estrés, frecuentemente incrementan su fracción lipídica, por lo que se han reportado valores en rangos más amplios(2).

Debido a escasos trabajos con especies de microalgas oleaginosas amazónicas, el objetivo general de este trabajo fue determinar el efecto de la intensidad luminosa en la producción de biomasa microalgal y acumulación de lípidos totales en cuatro especies de microalgas oleaginosas amazónicas a fin de contribuir con el fortalecimiento de las bases científicas sólidas para el mejoramiento de las condiciones de cultivo óptimo de las microalgas amazónicas del banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética-UCP.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1. General

- Determinar el efecto de la intensidad luminosa en la producción de biomasa microalgal y acumulación de lípidos totales en cuatro especies de microalgas oleaginosas amazónicas

2.2. Específicos

- Determinar la tasa de crecimiento de cuatro especies microalgales (*Ankistrodesmus* sp., *Chlorella* sp., *Scenedesmus quadricauda* y *Scenedesmus* sp.) cultivadas en tres condiciones de intensidad luminosa.
- Conocer la producción de biomasa en cuatro especies de microalgas oleaginosas amazónicas (*Ankistrodesmus* sp., *Chlorella* sp., *Scenedesmus quadricauda* y *Scenedesmus* sp.) cultivadas en tres condiciones de intensidad luminosa.
- Evaluar la acumulación de lípidos total de cuatro especies de microalgas oleaginosas amazónicas (*Ankistrodesmus* sp., *Chlorella* sp., *Scenedesmus quadricauda* y *Scenedesmus* sp.) cultivadas en tres condiciones de intensidad luminosa.

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO

3.1. Antecedentes:

Las tecnologías bioenergéticas se están desarrollando actualmente a una velocidad sin precedentes, debido a las políticas mundiales para mitigar el cambio climático, los precios crecientes del petróleo y la inseguridad del abasto de energéticos fósiles. Por lo tanto, la biomasa al ser una fuente de energía renovable puede ayudar a mitigar cambios, siempre y cuando se produzca de manera sostenible (18), la posibilidad de cultivar microalgas con fines económicos se ha venido explorando desde hace varias décadas, pero sin duda alguna uno de los campos en donde ha cobrado mayor auge, es en la acuicultura para la producción de alimento de larvas de moluscos, crustáceos y peces. (19). Las microalgas con elevadas productividades lipídicas son deseables para la elaboración de biodiesel, razón por la cual la cantidad de lípidos contenidos en la biomasa y la velocidad de crecimiento, sumados a la eficiencia metabólica y la robustez del microorganismo, son parámetros relevantes para su selección (7) y la producción de lípidos dentro de una investigación es sometida a condiciones de estrés impuestas por estímulos físicos y/o químicos(3).

Las investigaciones sobre el cultivo de microalgas revisten de gran importancia dada su amplia aplicación biotecnológica y comercial. En tal sentido, se han utilizado los cultivos discontinuos por su relativo fácil manejo, para determinar la cinética de crecimiento y los parámetros que influyen en el desarrollo poblacional de las microalgas (20). Sin embargo, el uso de los medios de cultivo sintéticos ha incrementado sustancialmente el valor económico para la producción de la biomasa de estos microorganismos (21). Por lo tanto, las condiciones óptimas de temperatura, intensidad luminosa, salinidad y nutrientes para el cultivo de microalgas, varían ampliamente de una especie a otra. Estos parámetros fisicoquímicos, han sido determinados en laboratorio y nos ayudan a comprender las condiciones óptimas para el desarrollo de las diferentes especies en cultivo.

Asimismo, las microalgas presentan altas tasas de producción, adaptabilidad a distintas condiciones ambientales y se encuentran presentes en cualquier medio acuático donde exista una fuente de carbono, nutrientes y luz suficiente, junto con los márgenes

apropiados de temperatura (22). Además, la composición de aminoácidos esenciales tales como los de *Scenedesmus* sp., se encuentra dentro de las normas establecidas por la organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO) y puede compararse con la proteína de la leche y del huevo (1).

Sin embargo, en las últimas décadas se ha destacado que las microalgas representan una alternativa más conveniente que cualquier otro tipo de organismo para la producción de triacilglicéridos y su conversión a biodiesel, ya que algunas especies oleaginosas, siendo organismos fotosintéticos, solo requieren energía solar, agua, CO₂ y algunas sales para producir muy altos rendimientos de biomasa rica en lípidos (23), la temperatura, el régimen de luz impuesto para el cultivo de las microalgas es uno de los aspectos críticos puesto que determina el rendimiento y la productividad de las biomásas (24).

También, algunos investigadores (25) observaron que Algunas microalgas son capaces de crecer a temperaturas elevadas respecto a otras cuyas óptimas temperaturas se encuentran entre 18 y 25°C. Aunque, las células a bajas intensidades luminosas expresaron mayor eficiencia fotosintética; pero comenzaron a saturarse a elevadas intensidad de luz. Además, indican que las células a bajas intensidades incrementaron la concentración de clorofila. Otros autores han demostrado que, *Chlorella* sp, al igual que muchas algas son capaces de utilizar substratos orgánicos, tales como azúcares y ácidos orgánicos, en completa oscuridad (26). El hecho que esta cepa de microalga optimice la producción de biomasa a bajas intensidades luminosas, sugiere su adaptación a cuerpos de agua con baja intensidad de luz, como suele ocurrir en los embalses.

3.2. Bases Teóricas

3.2.1. Generalidades de microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas fotosintéticos que dependen de la luz para su desarrollo y producción de materia orgánica. La respuesta fotosintética a la energía luminosa se caracteriza por una respuesta lineal baja al incremento en la irradiación, hasta llegar a su máxima capacidad fotosintética, donde las células son independientes de la irradiación (27). Bajo condiciones estables (no movimiento) las células se aclimatan a un nivel de irradiación, obteniendo bajo esas condiciones tasas de crecimiento y fotosintéticas no necesariamente óptimas mediante un ajuste en sus procesos fisiológicos. En células aclimatadas a bajas irradiancias, la concentración de clorofila se incrementa para poder obtener la energía luminosa necesaria para continuar con el proceso fotosintético. Por otro lado, células aclimatadas a altas irradiación, decrece la concentración celular de clorofila-*a* e incrementan la concentración de pigmentos accesorios foto protectores (carotenos) para evitar la oxidación de los fotosistemas. MacIntyre (28), reportó que células aclimatadas a alta iluminación no mostraron una tasa de crecimiento mayor que células en baja iluminación, porque a saturación de luz, las concentraciones de clorofilas fueron proporcionalmente mucho menores de la masa total de los pigmentos celulares expuestos a alta iluminación

3.3. Factores que influyen sobre el cultivo

Intensidad de luz.- La luz constituye un factor fundamental en todo cultivo de microalga, tanto para sí misma como por sus interrelaciones con otros parámetros. Representa la fuente de energía para la fotosíntesis, y tanto la intensidad luminosa como la longitud de onda y el fotoperiodo afectan al crecimiento y metabolismo microalgal (18). Asimismo, se necesita de cierta intensidad de luz para que se realice la fotosíntesis. La tasa de fotosíntesis aumenta con la intensidad luminosa, alcanzándose el nivel de saturación a intensidades variables en función de la especie, después de lo cual la intensidad se hace limitante, provoca la disminución de la tasa fotosintética y por tanto, del crecimiento. Una célula que se encuentre en condiciones limitadas de luz crecerá lentamente, pero hará que la mayor parte de la energía luminosa sea asequible al producir un sistema más eficiente de captura de luz. La adaptación a bajas intensidades implica un

incremento de dos a diez veces el contenido de clorofila por célula, a una intensidad de saturación menor y una pendiente inicial más pronunciada. Aunque, las células adaptadas a intensidades son más eficientes para absorber la energía luminosa, el rendimiento del quantum permanece constante, lo cual sugiere que no pueden utilizar la luz absorbida con mayor eficiencia. Si la intensidad de luz es alta, existe suficiente luz, el crecimiento celular es limitado más bien por la tasa de fijación de carbono, que a su vez depende del metabolismo de la célula. Así las células expuestas a intensidades altas de luz utilizan menos recursos propios para la síntesis de clorofila y más para la carboxilasa y quizás otra enzima de las reacciones oscuras.

Además, la radiación solar está íntimamente vinculada con el crecimiento y la productividad de las plantas, especialmente en la fracción del espectro comprendida entre 400 y 700 nm, definida como radiación fotosintéticamente activa (PAR). La conversión de la radiación PAR incidente y absorbida en energía química libre por la fotosíntesis, es vital en los sistemas biológicos.

La radiación fotosintéticamente activa, a su vez, puede considerarse compuesta por tres bandas, delimitadas por diferentes longitudes de onda (30), considerando, una banda en la que existe una fuerte absorción de luz por la clorofila, con alto efecto morfogenético, entre 400 y 510 nm. Una porción del espectro en la cual la clorofila absorbe muy débilmente la radiación, sin presentar efectos morfogenéticos, entre 510 y 610 nm. Además, una banda en la cual la absorción de la clorofila es muy importante, en la cual se presentan fuertes efectos morfogenéticos y ontogenéticos, entre 610 y 720 nm.

De la medición del PAR puede obtenerse información que permita, por ejemplo estimar el balance energético de un determinado sistema biológico, o el crecimiento de un cultivo en particular (31).

Si bien la radiación PAR es una de las informaciones requeridas para estudiar y modelar el crecimiento de los cultivos, no es frecuente contar con mediciones directas de esta variable, ya que no es una de las medidas de rutina en las estaciones meteorológicas. En general suele disponerse del dato de irradiación global (medida o estimada).

Para la medición directa del PAR existen sensores desarrollados a tal efecto, como el LI-190SA fabricado por LI-COR, y el PAR Lite, de la empresa KIPP & ZONEN. En ambos casos se utiliza como sensor un fotodiodo de silicio al que se modifica su respuesta y se le agrega un filtro para proporcionar una respuesta “cuántica” en el rango de longitudes de onda que van de 400 a 700 nm (32).

Aaslyng *et al.*, (33) construyeron y testearon un sensor que consistió de un fotodiodo de GaAsP y un disco difusor de acrilato blanco. Examinaron la respuesta al coseno, sensibilidad espectral y estabilidad de la calibración a largo plazo, y estas características satisficieron los requerimientos de un sensor PAR. La correlación con un sensor comercial estándar fue superior a 0.97.

En condiciones normales las microalgas están sometidas a períodos de luz/oscuridad y esta alternativa generalmente se utiliza en su cultivo. Sin embargo muchos aspectos de la fisiología microalgal fluctúan en un ciclo de 24 horas, esta periodicidad Sournia (18) se observa en la división celular, en muchas especies la mayoría de las células se dividen en un momento determinado del día o de la noche, lo que favorece su sincronización; al parecer la división nocturna ocurre en muchas especies. Además en la capacidad fotosintética se observa que las tasas máximas de fotosíntesis se producen en la mañana y las mínimas en las noches mientras que absorción de nutrientes de N y P son mayores durante el día que durante la noche, lo que refleja la influencia de la luz sobre la absorción.

La adaptación de las microalgas a variaciones extremas en la intensidad de luz, es decir, a la luz y sombra, es un fenómeno muy conocido y caracterizado por cambios en el contenido intracelular de pigmentos, generalmente acompañados en cambios en la respuesta fotosintética y en la composición bioquímica.

Los periodos de luz/oscuridad se ajustan para el cultivo de cada especie en particular. La introducción de un ciclo celular es un importante adelanto ya que el ciclo día-noche es quizás el factor cíclico ambiental más importante en la mayoría de los sistemas.

En cuanto a la calidad de luz (longitud de onda) se sabe que tiene efectos marcados sobre el crecimiento y varios procesos metabólicos, y puede afectar también a la composición

bioquímica. Así, la luz azul es un disparador para ciertos procesos metabólicos (18). La luz azul estimula un aumento de la respiración acompañado por la síntesis de *novo* de enzima y la producción de especies enzimáticas de mayor afinidad por el sustrato. En microalgas se ha establecido que varias enzimas relacionadas con la fotosíntesis están bajo el control de la luz azul (18).

La actividad de la fosfatasa alcalina en *Dunaliella tertiolecta*, *Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Prymnesium parvum* varía con la intensidad y calidad de luz de forma característica para cada especie (18). La composición espectral de la luz también afecta a la incorporación de fósforo e induce asimismo cambios en la radio N:P óptima también de forma característica en cada especie (18). La luz roja también afecta a ciertos aspectos del metabolismo microalgal.

Cuando los demás factores están dentro de límites razonables, la disponibilidad de luz es un factor que influye en la productividad de los cultivos microalgales masivos, de ahí la importancia de la fuente de luz para el cultivo.

La luz utilizada para el cultivo de microalgas puede ser luz natural, además tiene la ventaja de no suponer un gasto energético, pero tiene los inconvenientes de que no se puede controlar ni el fotoperiodo ni la intensidad: asimismo, se producen variaciones diarias, estacionales, en función del tiempo atmosférico, y la luz artificial tiene espectro de emisión que no son necesariamente idéntica a la luz del sol y la calidad de luz puede afectar al crecimiento, metabolismo, reproducción y morfología de una clase de microalga, por lo que hay que estudiar el espectro más favorable para cada tipo a cultivar.

Las lámparas fluorescentes tubular son la fuente de luz preferida para la iluminación de cultivos interiores. Estas dan menor calor que otros tipos de luz artificial y son igualmente eficientes en promover tasas de división y crecimiento máximos. Los tipos usados comúnmente son "Daylight", "Coll-White" y "Grolux".

3.4. Lípidos

Gran parte de los lípidos de las microalgas son ésteres de glicerol y ácidos grasos. La composición de los lípidos puede variar por diversos factores como son: la combinación de la luz, nutrientes, nitrógeno (nitratos) y temperatura. La fracción lipídica puede dividirse en dos grupos principales: los lípidos polares (glicolípidos y fosfolípidos) y los lípidos neutros (triglicéridos, diglicéridos, hidrocarburos, alquenonas, esteroides y pigmentos) (Fig. 1) (34).

La mayoría de los lípidos microalgales son lípidos polares que son componentes de membrana; mientras que los triglicéridos son una reserva de ácidos grasos para la división celular, energía metabólica, mantenimiento de la membrana, síntesis y una amplia variedad de funciones fisiológicas. Los triglicéridos pueden llegar a constituir hasta el 80% del total de lípidos en microalgas eucariotas. Las cantidades relativas de cada clase de lípido en las células microalgales pueden cambiar considerablemente con variaciones de las condiciones de cultivo (18). En las algas verdes, los ácidos grasos saturados pueden constituir del 15 al 30% de los ácidos grasos totales. Las microalgas verdes presentan bajas concentraciones de ácidos grasos mono insaturados (5-20%) y altas concentraciones de poli insaturados (50-80%) (35).

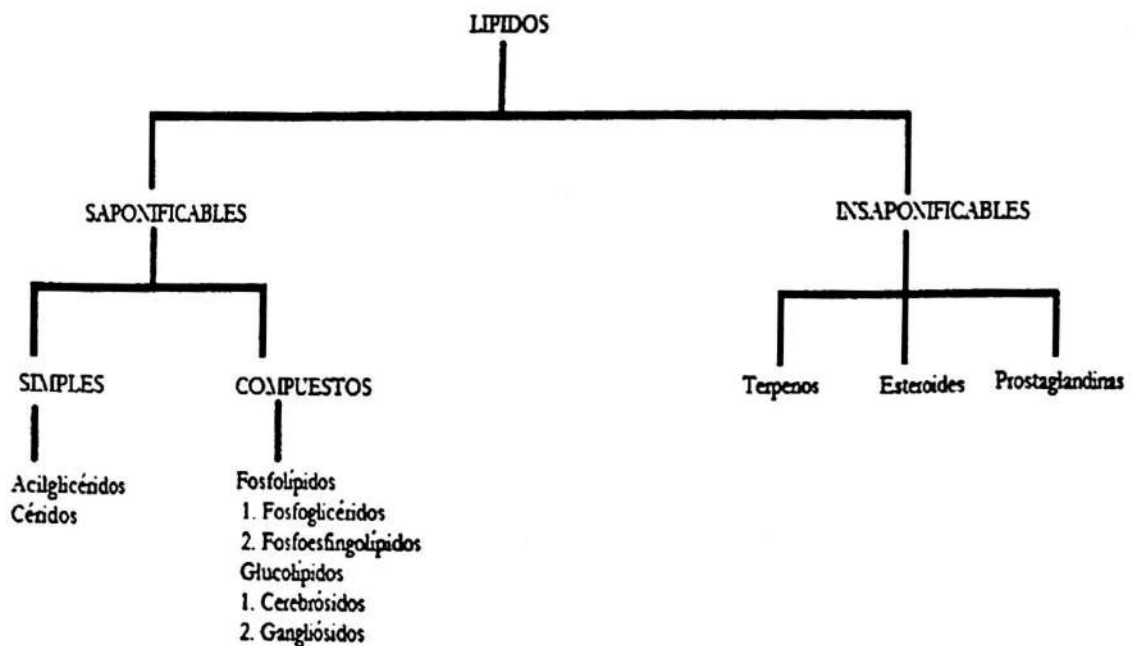


Figura 1: Clasificación de lípidos. Fuente: McMurry, J. (2004).

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 (36).

Los ácidos grasos son cadenas hidrocarbonadas lineales con un grupo metil (CH_3) y un grupo carboxilo al final (37). 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 (38). Los ácidos grasos poliinsaturados, se clasifican en $n-6(\omega-6)$ y $n-3(\omega-3)$ según la posición del doble enlace con respecto al medio terminal de la molécula. El principal ácido graso $n-6$ es el ácido linoléico ($18:2 \omega-6$), presente en los aceites vegetales de maíz, girasol y soya. El ácido γ -linolénico ($18:3 \omega-3$) predomina en las plantas; y aquellos ácidos grasos $n-3$ de cadena más larga, como el Eicosapentanoico (EPA, $20:5 \omega-3$) y el Decosahexanoico (DHA, $22:6 \omega-3$) abundan en los pescados, mariscos y aceites marinos (39).

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 (3).

3.5. Microalgas oleaginosas.

Las microalgas contienen ácidos grasos como componentes de su membrana, productos de almacenamiento, metabolitos y fuente de energía (40). Estos microorganismos representan una opción viable como materia prima para producir biodiesel, debido a la mayor productividad de biomasa y mayor velocidad de replicación con respecto a plantas cultivables (6), algunas especies pueden acumular entre 20-80% (peso seco) de triglicéridos (41), no requieren terrenos cultivables para el crecimiento celular y no compiten por alimento humano (42). 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 (43). 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 (6).

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 (44).

3.6. Definición de términos básicos:

Microalgas: organismos acuáticos microscópicos que viven en agua o superficies húmedas. Tienen numerosas utilidades: industriales, medicinales y agricultura. Son esenciales para el mantenimiento de la vida acuática. Existen alrededor de 18,000 especies, entre ellas las verdes, las pardas, las rojas y las azuladas.

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).

Biomasa: masa total de organismos en un área determinada.

Lípidos: término colectivo que describe un grupo de sustancias en la célula caracterizadas por su solubilidad en solventes orgánicos como el éter y el benceno, y su no solubilidad en agua. A nivel simple u compuesto.

Fotosíntesis: se llama así al proceso mediante el cual las plantas producen su propio alimento. 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.

Intensidad luminosa: se define como la cantidad de flujo luminoso que emite una fuente por unidad de ángulo sólido.

Temperatura: es una magnitud referida a las nociones comunes de caliente, tibio o frío que puede ser medida con un termómetro. En física, se define como una magnitud escalar relacionada con la energía interna de un sistema termodinámico, definida por el principio cero de la termodinámica.

Autótrofo: Dicho de un organismo: Que es capaz de elaborar su propia materia orgánica a partir de sustancias inorgánicas; p. ej., las plantas clorofílicas.

Cultivar: es dar a la tierra y a las plantas las labores necesarias para que produzcan.

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

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Lugar y desarrollo de la investigación.

El presente trabajo de investigación se realizó 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
- ✓ Probetas
- ✓ Tips de 100,200 μ l
- ✓ Alcohol (70% y 96%)
- ✓ Microtubos (1.5ml)
- ✓ 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 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$)
- ✓ 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 Fluorescencia)
- ✓ Excel de Microsoft Office

4.3. Aspectos metodológicos:

Tipo y diseño de investigación

Este estudio aplicó la investigación descriptiva, permitiéndonos estudiar los efectos de la intensidad luminosa en la producción de biomasa microalgal y en la acumulación de lípidos totales en cuatro especies de microalgas oleaginosas amazónicas. El diseño fue de tipo experimental, que consistió en cultivar cuatro especies de microalgas en 200mL de medio CHU con todos los nutrientes que lo constituyen, en frascos de 1000 mL. por triplicado. Al cabo de 04 semanas se realizó la cosecha de la biomasa microalgal para dar inicio a la evaluación. Para ello se colocó 1mL de biomasa microalgal en frascos de 250 ml conteniendo 200 ml de medio CHU10 por 7 días. Se instalaron los cultivos microalgales bajo tres condiciones de intensidad luminosa ($34 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, $73 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, $121 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$). Posteriormente, cumplido el periodo de evaluación, se cosecharon las microalgas por centrifugación para realizar el análisis de lípidos total. Estos tratamientos se realizaron por triplicado.



Figura 02. Diseño del experimento.

4.4. Muestra.

La muestra estuvo representada por las microalgas oleaginosas (*Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp., *Scenedesmus quadricauda* y *Scenedesmus* sp.) del banco de cepas de microalgas 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 establecidas para las siguientes variables, fueron de acuerdo a Ettore *et al.*(45) Además se procedió a recopilar los datos procediendo de la siguiente manera:

Observación: Estuvo dirigida para la obtención de información directa de los resultados de la acumulación de lípidos totales por las diferentes intensidades lumínicas en cada una de las microalgas para la extracción de lípidos totales.

La biomasa se calculó por diferencia de peso de la placa petri con y sin biomasa seca y mientras que para la Tasa de crecimiento microalgal se realizaron por conteo directo

utilizando la cámara Neubauer, anotándose los datos en fichas de registro, para luego calcularlos mediante la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{\log_2(N_1/N_0)}{t_1 - t_0}$$

En donde:

N_1 - número de células o densidad óptica al tiempo final

N_0 - número de células o densidad óptica al tiempo inicial

t_1 = tiempo final

t_0 = tiempo inicial.

4.5.2. Instrumento de recolección de datos:

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

- a). Fichas o guías de observación. Se utilizaron 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 Fluorescencia, el microscopio compuesto, cabina de flujo laminar y la cámara Neubauer.

4.5.3. Procedimiento Experimental.

4.5.3.1. Cultivo inicial y cosecha microalgal.

Se emplearon cuatro cepas de microalgas oleaginosas que fueron proporcionadas por el Banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética-UCP. Las mismas que fueron cultivadas en matraces de 1000 mL por duplicado con 200 mL de medio CHU10 hasta su saturación. Cada matraz tuvo un flujo de aire constante, a 25°C y un fotoperiodo de (12:12) luz/oscuridad con una intensidad lumínica de 31 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{S}^{-1}$.

Una vez alcanzado la saturación (4 semanas) del cultivo se realizó la cosecha respectiva, que consistió en distribuir 15 mL del cultivo en 12 tubos de 15 mL para centrifugar a 4000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. 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.

4.5.3.2. Evaluación de los bioensayos con intensidad luminosa

Para los ensayos, se usaron 12 mL de biomasa microalgal obtenida de la cosecha de cada especie de microalga y fueron distribuidas en matraces de 250 mL para los ensayos

respectivos, que contaron con un grupo control y un grupo problema: 200 ml de medio CHU10 más 1 ml de biomasa. El grupo control estuvo bajo las siguientes condiciones: 31 $\mu\text{E. m}^2. \text{S}^{-1}$ de intensidad lumínica, 25°C de temperatura, aireación constante, fotoperiodo (12:12) luz/oscuridad por 46% de humedad relativa. El grupo problema estuvo bajo tres condiciones de intensidad luminosa (34 $\mu\text{E.m}^2.\text{s}^{-1}$, 73 $\mu\text{E.m}^2.\text{s}^{-1}$, 121 $\mu\text{E.m}^2.\text{s}^{-1}$) seguido de los mismos parámetros del grupo control. Estos ensayos se realizaron por triplicado por 7 días. Durante este proceso de evaluación se realizó la lectura diaria de la densidad celular.

4.5.3.3. Cosecha de la Biomasa microalgal.

Una vez culminado la evaluación, se cosecharon las microalgas como se indicó previamente, la biomasa obtenida fue secada a 50 °C por 24 horas (55)

4.5.3.4. Extracción y análisis de lípidos totales.

La extracción de lípidos totales se realizó de acuerdo a 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 y se añadió 100 μL de NaCl 0,9% por cada 1000 μL de extracto. La solución se homogenizó en vórtex por 30 seg y centrifugó a 23000g a 4°C por 5 min. La fase clorofórmica se esterilizó con filtros para jeringa de 0,45 μm y 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 vórtex. 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 recipiente 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 se determinó su peso. Por diferencia de peso del vaso de precipitado con y sin los lípidos se determinaron la cantidad de lípidos totales obtenidos. Utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de lípidos (\%)} = PL/PM \times 100$$

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 lípidos totales, la producción de la biomasa, la tasa de crecimiento microalgal y la relación entre la producción la biomasa y lípido total, para los cuales se empleó la estadística descriptiva e inferencial mediante el programa IBM SPSS Statistics 21 y las figuras fueron diseñados en ANOVA con prueba de HSO de Tukey.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.1 Tasa de crecimiento (μ) de cuatro microalgas cultivadas bajo tres condiciones de intensidad luminosa.

En general, las cuatro microalgas evaluadas mostraron un incremento gradual en las tasas de crecimiento conforme fueron tratadas en mayores intensidades luminosas. Sin embargo, es evidente que las microalgas *Scenedesmus sp.* y *Chlorella sp.* alcanzaron mayores tasas de crecimiento ($0,548 \text{ d}^{-1}$ y $0,378 \text{ d}^{-1}$ respectivamente) respecto a *Scenedesmus quadricauda* que reportó una tasa de crecimiento máxima de $0,098 \text{ d}^{-1}$ al ser sometida a $121 \mu\text{E.m}^2.\text{s}^{-1}$ (Tabla 1). Por lo que, la intensidad de luz influye en la tasa de crecimiento de las cuatro especies de microalgas, es decir a mayor intensidad de luz mayor tasa de crecimiento.

Tabla 1. Valores promedio de la tasa de crecimiento (μ) de cuatro especies microalgales oleaginosas cultivadas en diferentes condiciones de intensidad luminosa

ESPECIE	tasa de crecimiento (dia^{-1})			
	$31 \mu\text{E.m}^2.\text{s}^{-1}$	$34 \mu\text{E.m}^2.\text{s}^{-1}$	$73 \mu\text{E.m}^2.\text{s}^{-1}$	$121 \mu\text{E.m}^2.\text{s}^{-1}$
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	$0,105 \pm 0.020$	$0,102 \pm 0.007$	$0,111 \pm 0.012$	$0,109 \pm 0.006$
<i>Chlorella sp.</i>	$0,339 \pm 0.030$	$0,335 \pm 0.034$	$0,349 \pm 0.040$	$0,378 \pm 0.011$
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	$0,078 \pm 0.032$	$0,079 \pm 0.008$	$0,084 \pm 0.029$	$0,098 \pm 0.028$
<i>Scenedesmus sp.</i>	$0,506 \pm 0.020$	$0,536 \pm 0.020$	$0,548 \pm 0.020$	$0,519 \pm 0.020$

5.2. Perfil de crecimiento de cuatro microalgas oleaginosas cultivadas en diferentes condiciones de intensidad luminosa.

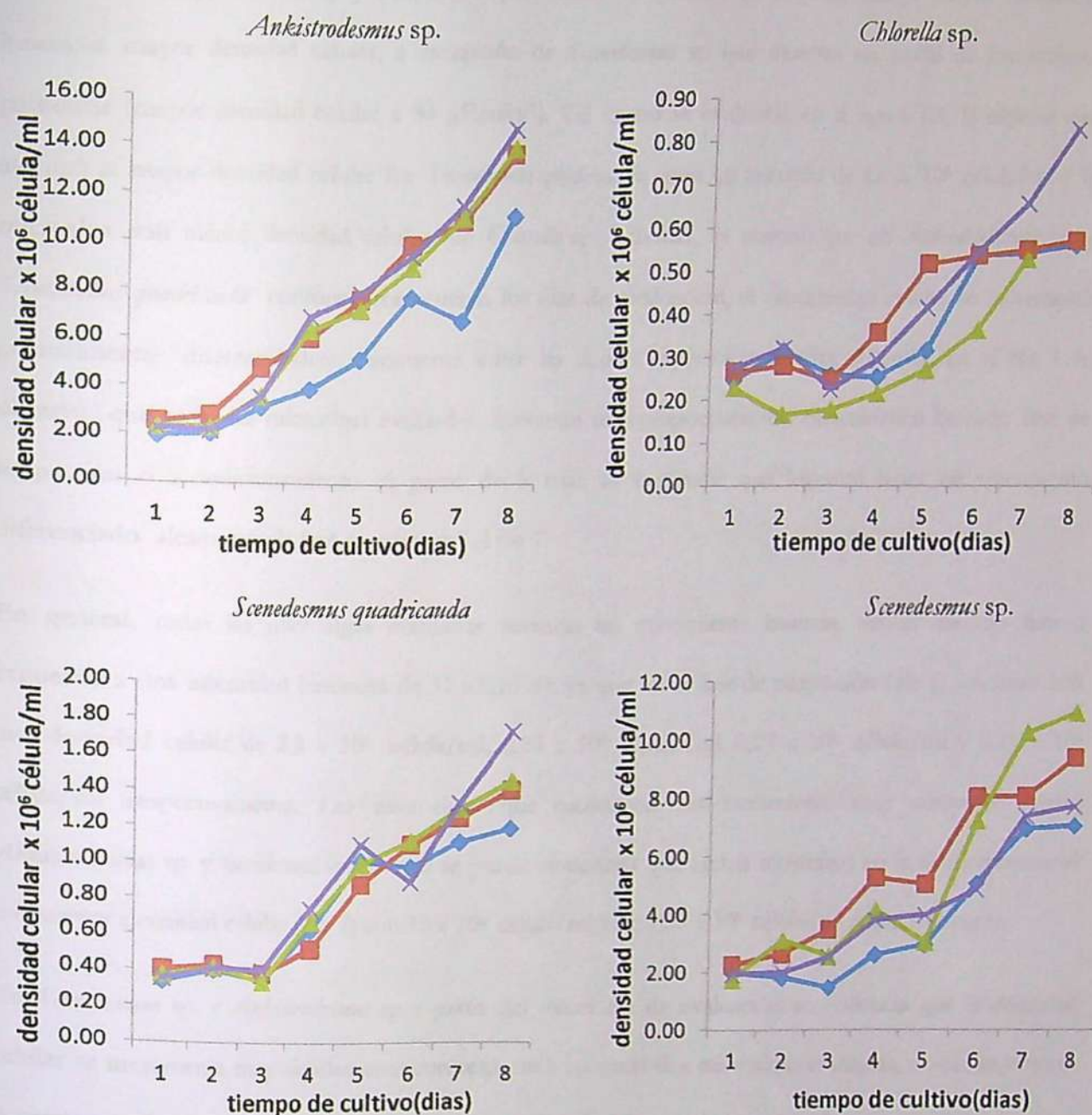


Figura 3: perfil de crecimiento de cuatro especies de microalgas oleaginosas amazónicas cultivadas en diferentes condiciones de intensidades luminosas.

Observamos las especies estudiadas *Ankistrodesmus sp.*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus quadricauda* y *Scenedesmus sp.* Los colores diferencian las distintas intensidades luminosas (■ 31 μE.m².s⁻¹, ■ 34 μE.m².s⁻¹, ▲ 73 μE.m².s⁻¹ y ✕ 121 μE.m².s⁻¹)

El perfil de crecimiento de las microalgas evaluadas por lo general muestran un comportamiento similar en *Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp y *Scenedesmus quadricauda* en donde es evidente que a mayor intensidad luminosa mayor densidad celular, a excepción de *Scenedesmus* sp que muestra un perfil de crecimiento particular (mayor densidad celular a $34 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$). Tal como se evidencia en la figura 03, la especie que alcanzó la mayor densidad celular fue *Scenedesmus quadricauda* con un máximo de 18×10^6 célula/ml y la microalga con menor densidad celular fue *Chlorella* sp. Además, es notorio que en *Ankistrodesmus* sp. y *Scenedesmus quadricauda* conforme transcurren los días de evaluación, el crecimiento celular se incrementa gradualmente diferenciándose claramente entre las demás especies evaluadas. Además, en el día 1 se observa que todas las microalgas evaluadas, muestran un comportamiento característico llamado fase de adaptación o acondicionamiento. A partir de la cual, se evidencia que lograron tener un crecimiento diferenciado alcanzando la fase exponencial el día 7.

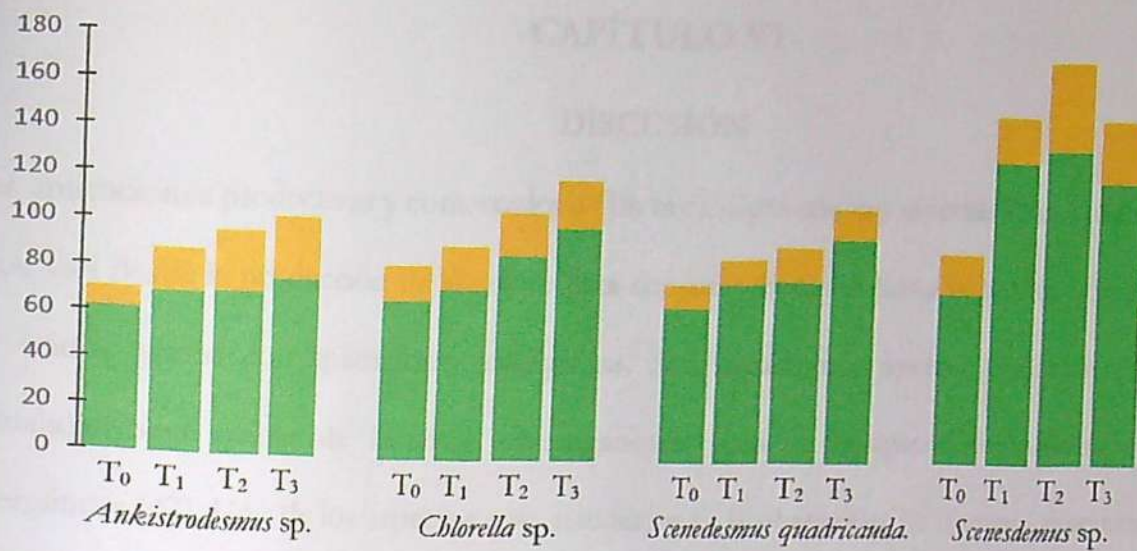
En general, todas las microalgas evaluadas tuvieron un crecimiento bastante similar cuando fueron expuestas a una intensidad luminosa de $31 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, ya que en la fase de adaptación (día 1) iniciaron con una densidad celular de $2,8 \times 10^6$ célula/ml, $2,26 \times 10^6$ célula/ml, $0,27 \times 10^6$ célula/ml y $0,41 \times 10^6$ célula/ml respectivamente. Las microalgas que mostraron un crecimiento muy marcado fueron *Ankistrodesmus* sp. y *scenedesmus* sp. Ya que se puede evidenciar que ambas mostraron en la fase exponencial una mayor densidad celular (día 7) con 13×10^6 célula/ml y de $9,38 \times 10^6$ célula/ml respectivamente.

En *Scenedesmus* sp. y *Ankistrodesmus* sp a partir del tercer día de evaluación se evidencia que la densidad celular se incrementa muy rápidamente con respecto a las otras dos microalgas evaluadas, donde es notorio la existencia de una fase de acondicionamiento, en el cual cada una de las microalgas mantiene su densidad celular de $1,99 \times 10^6$ célula/ml, $0,32 \times 10^6$ célula/ml, $2,20 \times 10^6$ célula/ml y $0,41 \times 10^6$ célula/ml respectivamente, a partir de la cual se observa el inicio de la fase exponencial a partir del día dos. Siendo más pronunciado en *Ankistrodesmus* sp., que mostró una densidad celular máxima el día 7 con $14,70 \times 10^6$ células/ml. También *Scenedesmus* sp., reportó una densidad celular máxima de $7,71 \times 10^6$ células/ml, iniciándose la fase exponencial el día tres con una densidad celular de $2,53 \times 10^6$ células/ml.

5.3. Producción de biomasa y contenido de lípidos totales en cuatro especies de microalgas oleaginosas amazónicas cultivadas en medios CHU10 a distintas intensidades luminosas

En general, en las cuatro especies de microalgas evaluadas se observa una relación directa entre la cantidad de biomasa y la intensidad de la luz a que fueron sometidos los cultivos. Asimismo, el contenido de lípidos también mostró incremento en función a la intensidad de la luz en el cultivo de la microalga *Ankistrodesmus* sp y una tendencia similar se observó en *Scenedesmus* sp, pero este patrón no se observó en las demás especies evaluadas. Además, la mayor producción de biomasa y mayor porcentaje lipídico se evidencia en *Scenedesmus* sp (136 mg/ml y 38.5% respectivamente) seguido de *Ankistrodesmus* sp que presentó porcentajes lipídicos de 25% y 26%. Al ser sometidas a mayores intensidades de luz. Estadísticamente estas microalgas también mostraron las mayores proporciones de lípidos, tal como se puede apreciar en la figura 4, mientras que *Chlorella* sp. y *Scenedesmus quadricauda* mostraron proporciones menores.

Por lo que, la inducción de lípidos totales en medio CHU10 tratados con diferentes intensidades luminosas no mostraron diferencias significativas, tal como se evidencia en la figura 4, donde *Ankistrodesmus* sp tiene un valor de 27% en la acumulación de lípidos totales en la intensidad luminosa de $73 \mu\text{E} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, sin embargo, no muestra una diferencia significativa ($p > 0,05$), de igual manera, *Scenedesmus* sp. tuvo valores altos de 22% en la acumulación de lípidos totales en la misma intensidad luminosa del mismo modo no mostró diferencia significativa con ($p > 0,05$).



Correlación entre intensidades luminosas y especies microalgal

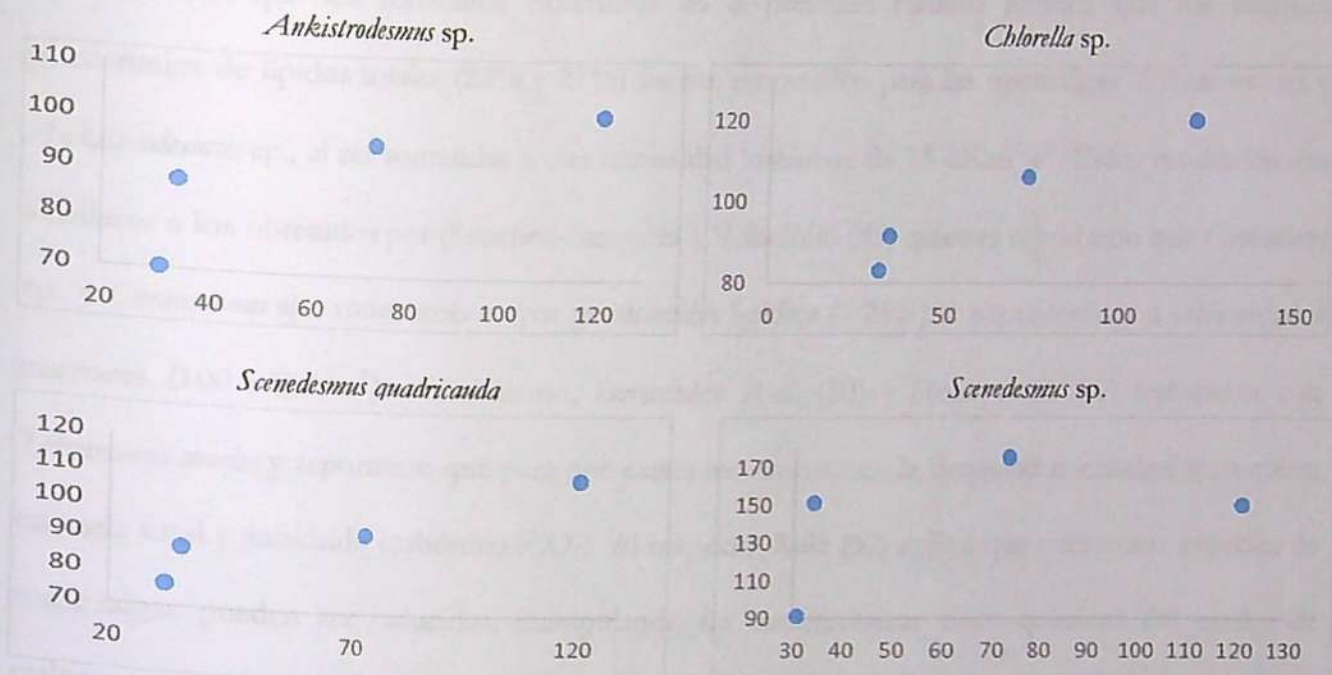


Figura 4: Biomasa en peso seco (mg/L) y contenido de lípidos totales (%) de cuatro especies de microalgas oleaginosas cultivadas en medio CHU10 a diferentes intensidades luminosas. En las barras de arriba se observa las especies microalgales con los tratamientos en las distintas intensidades luminosas (T₀: 31 μE.m².s⁻¹, T₁: 34 μE.m².s⁻¹, T₂: 73 μE.m².s⁻¹ y T₃: 121 μE.m².s⁻¹)

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

Las aplicaciones productivas y comerciales de las microalgas son tan diversas como numerosas, sus usos van desde la producción de alimento para consumo humano hasta la producción en cantidad de ácidos grasos con aplicaciones energéticas. Son organismos apenas explorados, que en la actualidad son objeto de intensas investigaciones para la búsqueda de nuevas alternativas energéticas (47). Uno de los aspectos más estudiados es la obtención de biomasa y acumulación de lípidos microalgales bajo diversas condiciones de cultivo (48).

Es por ello, que los resultados obtenidos en el presente estudio refieren que los mayores porcentajes de lípidos totales (22% y 27%) fueron reportados para las microalgas *Scenedesmus* sp. y *Ankistrodesmus* sp., al ser sometidas a una intensidad luminosa de $73 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$. Estos resultados son similares a los obtenidos por (Sánchez-Saavedra y Voltolina) (49) quienes reportaron que *Chaetoceros* sp. y *Chroomonas* sp. mostraron mayor producción lipídica (>25%) al ser sometidas a intensidades mayores ($100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$). Asimismo, Bermúdez *et al* (50) y Helm *et al* (51) trabajaron con *Tetraselmis suecica* y reportaron que para que exista incremento en la densidad microalgal se requiere energía total y anhídrido carbónico (CO_2). Al respecto, Ruiz (52) indica que numerosas especies de microalgas pueden ser inducidas, manipulando las características físico-químicas del medio de cultivo, a producir elevadas cantidades de lípidos o ácidos grasos, que pueden ser posteriormente empleados para la producción de biodiesel. Estas manipulaciones pueden ser simples, como variación de la salinidad, temperatura, pH o disponibilidad de micronutrientes. La acumulación de lípidos se atribuye a un consumo de azúcares mayor al crecimiento celular, que favorece la conversión a lípidos de los azúcares en exceso. Sin embargo, y por regla general, las microalgas con alto contenido lipídico no presentan altas velocidades de crecimiento. Es por ello que lo que se

busca optimizar es la producción neta de lípidos por unidad de volumen de reactor o de superficie ocupada.

Por lo que, el menor crecimiento de las dos microalgas (*Chlorella* sp. y *Scenedesmus quadricauda*) bajo condiciones mínimas de intensidad luminosa probablemente se debe a que las microalgas no se adaptaron a estas condiciones, ocurriendo un déficit en la energía necesaria para la reproducción celular atribuible a la disminución en la actividad fotosintética y/o al aumento en la respiración (52). El mayor crecimiento presentado bajo condiciones altas de intensidad luminosa ($73 \mu\text{E. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y $121 \mu\text{E. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) en las especies *Scenedesmus* sp y *Ankistrodesmus* sp. son similares a los resultados obtenidos por James *et al.* (50) quienes trabajaron con *Chlorella* sp. y *Nannochloropsis* sp. Por lo que, Dawson (53) afirma que es posible que el crecimiento puede mantenerse si la intensidad lumínica es lo suficientemente alta para permitir que la fotosíntesis mantenga la respiración, en lugar de las reservas corporales. Corroborando los resultados obtenidos en el presente estudio.

En este estudio, se sugiere que los ensayos de mayor intensidad luminosa ocasionaron un aumento en la tasa fotosintética por encima de la tasa respiratoria dando como resultado mayores densidades algales que en condiciones de baja intensidad luminosa. Contrariamente, en los tratamientos de baja luminosidad, se pudo provocar el aumento en la tasa de fotosíntesis, ocasionando bajos crecimientos y densidades celulares.

Los resultados obtenidos en las tres diferentes condiciones de iluminación aparentemente favoreció la producción de biomasa microalgas y la acumulación de lípidos totales en cada una de las cuatro especies sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas en ambos casos.

Por lo que se recomienda continuar con estudios más detallados utilizando otros datos de intensidad luminosa y en mayor número de especies de microalgas oleaginosas nativas.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

- La microalga que mostró la mayor tasa de crecimiento fue *Scenedesmus* sp., al ser sometida a condiciones de intensidad luminosa de $73 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$.
- La mayor producción de biomasa fue reportado por *Scenedesmus* sp., al ser sometida a condiciones de intensidad luminosa de $73 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$.
- La especie microalgal que mostró la mayor producción de lípidos totales fue *Ankistrodesmus* sp., con intensidad luminosa ($73 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$).
- Las altas tasas de crecimiento son debido a la gran capacidad fotosintética de algunas microalgas a altas intensidades luminosas, así mismo el efecto que tiene la temperatura son también otra variable a la contribución del crecimiento, acumulación de lípidos y aumento de biomasa

CAPÍTULO VIII

RECOMENDACIONES

Los valores de biomasa, densidad celular y del contenido lipídico fueron obtenidos en un período de 7 días sin embargo el incrementar aún más por un mayor o menor tiempo de estrés cabe la posibilidad el aumento de todos los valores lo cual se hubiera podido observar en este trabajo de investigación. Por lo que se recomienda ampliar los estudios con un tiempo mayor y con otras especies de microalgas amazónicas.

Los valores de biomasa y del contenido lipídico fueron obtenidos expuestos por distintas intensidades luminosas donde se observó comportamientos similares. Por lo que se recomienda realizar experimentos estableciendo una determinada intensidad e incluyendo la temperatura de acuerdo a lo analizado en este trabajo se tendrá mejores resultados y mejor calidad de los cultivos y evaluaciones.

Los cultivos deberán ser unialgales para garantizar los resultados de buena calidad del contenido lipídico y evitar la competencia por los nutrientes entre microorganismos y así obtendremos una mejor calidad y mejores resultados en los trabajos de investigación

CAPÍTULO IX

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arredondo BO, Vázquez-Duhalt R. Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Cienc Desarro.* 1991; (17):99-111.
2. Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P. A look back to the US Department of Energy's Aquatic Species Program – biodiesel from algae. *National Renewable Energy Laboratory, Golden CO.* 1998;(580-24190):328.
3. Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 2008;(54):621-39.
4. Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, et al. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 2009;(102):100-12.
5. Waltz E. Biotech's new gold? 2009;(27):15-8.
6. Chisti Y. Biodiesel from microalgae *Biotechnology Advances.* 2007;25:294- 306.
7. Rosenberg JN, Oyler GA, Wilkinson L, Betenbaugh MJ. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr. Opin. Biotechnol revolution.* *Curr Opin Biotechnol.* 2008;(19):430-6.
8. Spolaore, P, Joannis-Cassan, Duran, E, Isambert, A. Commercial applications of microalgae. *Biosci Bioeng.* 2006;(101(2)):87-96.
9. Thomas, W. H., D. Siebert, M. Alden, A. Neori & P. Eldridge. 1984. Yields, photosynthetic efficiencies and approximate composition of dense marine microalgal cultures. *Biomass,* 5:181-209.
10. Molina Grima, E, Acien Fernandez, F. G, Garcia Camacho, F, Chisti, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale up. *J Biotechnol.* 1999;(70):231-48.
11. Barsanti, Laura, Gualtieri, Paolo. *Algae. Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology.* Taylor Francis Group. 2006;301.
12. Torzillo G, Giannelli L, Martinez Roldan Aj, Verdone N, De Filippis P, Scarsella M, et al. Microalgae culturing in thin-layer photobioreactors. *Chem Eng Trans.* 2010;20(45):265-270.
13. Martínez Roldán Aj, Ponce-Noyola Mt, Esparza García F, Cristiani Urbina E, Torzillo G, Cañizares Villanueva Ro. Efecto de la concentración de NaCl sobre el crecimiento, consumo de nutrientes y contenido específico de lípidos en *Nannochloropsis* sp. *Bol Soc*

Argent Bot. 2011;46(Supl.2):43-44.

14. Coutteau P, LAVENS, P, SORGELOOS, P. Manual on the production use of live food for aquaculture. FAO. 1996;295.
15. Leonardos L, Lucas I. The nutritional value of algae grown under different culture conditions for *Mytilus edulis* L. larvae. 2000;301-15.
16. Tzovenis I, De Pauw N, Sorgeloos P. Optimization of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids I. Effect of different light regimes on growth and biomass production. Aquac 2003. 2003;203-22.
17. Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G. y Legrand, J. 2009. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource Technology*. 100(23): 598Bf8-5995.
18. Estrada, G. C, Islas, S. J. Energías Alternas: Propuesta de investigación y Desarrollo Tecnológico para México. Acad Mex Cienc México. 2010;
19. Soeder, C. J. An historical outline of applied algology. In *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Richmond Ed CRC Press Inc Boca Raton Fla. 1986;25-41.
20. Abalde A., Cid A, Fidalgo P., Torres E, Herrero C. *Microalgas: Cultivos y Aplicaciones*. Universidad de La Coruña. 1995;1- 210.
21. González B, E. Buitargo, K. Frontado. Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura. 1999;
22. Shelef, S, J. Soeder. *Algae Biomass. Production and Use*. Elsevier- North Holland Biomedical Press. 1980;(852 pp).
23. Li Q, Du W, Liu D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2008;(80):749-56.
24. Treece G, FOX J. Design operation and training manual for an intensive culture shrimp hatchery. Texas A&M. Univ Sea Grant Coll Program Tex. 1993;
25. N Steeman, Hansen V, Jørgensen E. *Physiol plant*. 1962;(15):505-17.
26. Fogg G.E. *Algal cultures and phytoplankton ecology*. Second Ed Univ Wis Press. 1977;126.
27. Abalde, J, Herrero, C. *Microalgas en acuicultura: calidad nutricional*. diciembre de 2004;16-8.
28. MacIntyre H, Kana, L, Todd, M, Tracy, A, Gaider, R.J. Photoacclimation of Photosynthesis irradiance response curves and Photosynthetic pigment in Microalgae and Cyanobacteria. 2002;17-38.

29. C A, Bold H. *Algae and fungi*. 1967;368 - 392.
30. Larcher W. *Ecofisiología vegetal*. Ediciones Omega, Barcelona, España. (1977).
31. Magrin G., Díaz R., Rebella C., Del Santo C. y Rodríguez R. Simulación del crecimiento y desarrollo de trigo en Argentina y la necesidad de información meteorológica de entrada. *Anales del CONGREGMET IV*. (1991); pp 49-50.
32. Righini R. y Grossi Gallegos H. Análisis de la correlación entre la radiación fotosintéticamente activa y la radiación solar global en San Miguel, provincia de Buenos Aires. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente* (2005)9, 11.01- 11.04.
33. Aaslyng J.M., Rosenqvist E., Høgh-Schmidt K. A sensor for microclimatic measurement of photosynthetically active radiation in a plant canopy. *Agricultural and Forest Meteorology* (1999); 96, 189-197.
34. Brown, M. R, Jeffrey, S. W, Garland, C. D. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture. *CSIRO Mar Lab*. 1989;(205).
35. Schmidt, J. C. Efecto de la composición bioquímica de microalgas sobre el valor nutritivo de dos cepas de Artemia. Instituto Politécnico Nacional (IPN). Cent Interdiscip Cienc Mar CICIMAR Paz Baja Calif Sur Tesis Maest. 1999;69.38. Schanz F, Zahler U. Prediction of algal growth in batch cultures. *Schweiz Z Hydrobiol*. 1981;(43):103-13.
36. Madigan M Martinko J Parker J. Brock: *Biología de los microorganismos*. 1999;
37. Metz J Roessler P Facciotti D Levering C Dittrich F Lassner M. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science*. 2001;293(5528):291- 293.
38. Badui S. *Química de los alimentos*. 3ª Ed México DF Pers. 1993;
39. Hernández A. Metabolismo y actividad biológica de los ácidos grasos omega -3. *Nutr Dietética Hosp*. 2004;(24):49-54.
40. Demirbas A. Energy Sources Part A. *Recovery Util En Environ Eff*. 2010;32(10):909:910.
41. Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol*. 2011;26(3):3 126-31.
42. Amaro H, Guedes A, Malcata F. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Appl Energy*. 2011;(88):3402-10.
43. Mutanda T, Bux F, Ramesh D, Karthikeyan S, Kumari S, Anandraj A. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresour Technol*. 2010;(102):57-70.

44. Illman AM, Scragg AH, Shales SW. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb Technol.* 2000;(27):631-5.
45. Ettore S, Cabrera C, Catalano A, Angalitti P. *Materiales y Equipos de Laboratorio.* 2012;
46. Yu X, Zhao P, He C, Li C, Zhou J, Huang Z. Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. *Bioresour Technol.* 2012; 121:256-262.
47. Brennan, M., Owende, P. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (2010)14, 557-577.
48. Cobos M., Castro J.C., & Cerderia Gutierrez Luis. Potencial biotecnológico para la producción sustentable de biodiesel de microalgas oleaginosas aisladas del río itaya, loreto, Perú. 2014 *ecología aplicada.* 13(2).
49. Sánchez-Saavedra, M.P. y D. Voltolina. The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under different light conditions. *Comp. Bioch. Phys. Part B: Bioch. Mol. Biol.* (1994) 107: 39-44.
50. Bermúdez, J., C. Lodeiros y E. Morales. Producción de biomasa de la microalga marina *Chroomonas* sp., en función del pH, intensidad luminosa y salinidad. *Bol. Inv. MAr. Cos.* (2002) 31: 167-185.
51. Helm M.M., N. Bourne y A. Lovatelli. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual Práctico. FAO Documento Técnico de Pesca 471. Roma. (2006) 184 p.
52. Ruiz-Martínez A. cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Master thesis. Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. Universitat Politècnica de Valencia. Spain. (2011)
53. James, C.M., S. Al-Hinty y A. E. Salman. Growth and W3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture.* (1989) 77: 337-351.
54. Dawson, E.Y. *Marine botany. An Introduction.* Holt, Rinehart y Winston, Inc. New York: (1966) 242-259)
55. Paredes Rodríguez, Jae Diana. Impacto de la eliminación de nitrógeno en la acumulación de lípidos totales en cinco especies de microalgas oleaginosas. (trabajo para optar por el título de licenciado en ecología). 2014. Universidad Científica del Perú.