



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE NITRÓGENO  
PARA UN CULTIVO DE *Chlorella* sp. NATIVA Y SU EFECTO  
SOBRE EL CONTENIDO LIPÍDICO, EN EL LABORATORIO DE  
BIOTECNOLOGÍA ENERGÉTICA - EMPRESA ELÉCTRICA  
QUITO - ECUADOR.**

**AUTOR: CARGUA CAIZA DANIELA ELIZABETH**

**DIRECTOR: Dr. PETRONIO GAVILANES**

**CODIRECTOR: ING.MARCO TAIBE**

**SANGOLQUÍ, MAYO DE 2015**

## CERTIFICACIÓN

**Dr. Petronio Gavilanes**

**Ing. Marco Taipe**

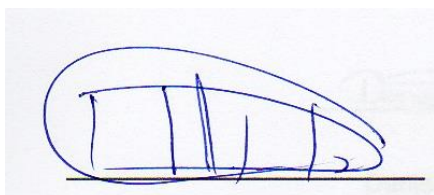
**Certifican:**

Que el trabajo titulado “EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE NITRÓGENO PARA UN CULTIVO DE *Chlorella* sp. NATIVA Y SU EFECTO SOBRE EL CONTENIDO LIPÍDICO, EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA ENERGÉTICA - EMPRESA ELÉCTRICA QUITO - ECUADOR.”, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas en el Reglamento de Estudiantes de la Universidad De Las Fuerzas Armadas – ESPE.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf).

Autorizan a DANIELA ELIZABETH CARGUA CAIZA que lo entregue a la M.Sc. MARÍA AGUSTA CHAVEZ, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, Mayo de 2015

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'P' followed by several vertical lines and a horizontal line at the bottom.

Dr. Petronio Gavilanes

DIRECTOR

A handwritten signature in blue ink, featuring a large, stylized 'M' followed by 'arco Taipe' and a horizontal line at the bottom.

Ing. Marco Taipe

CODIRECTOR

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD


DANIELA ELIZABETH CARGUA CAIZA

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE NITRÓGENO PARA UN CULTIVO DE *Chlorella* sp. NATIVA Y SU EFECTO SOBRE EL CONTENIDO LIPÍDICO, EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA ENERGÉTICA - EMPRESA ELÉCTRICA QUITO - ECUADOR.”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando los derechos intelectuales de terceros, conforme a las citas que constan en el texto cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Mayo de 2015.



---

Daniela Elizabeth Cagua Caiza

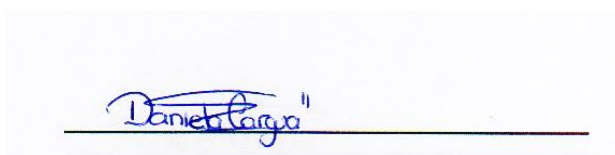
## AUTORIZACIÓN

DANIELA ELIZABETH CARGUA CAIZA

Autorizo que:

El proyecto de grado denominado “EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE NITRÓGENO PARA UN CULTIVO DE *Chlorella* sp. NATIVA Y SU EFECTO SOBRE EL CONTENIDO LIPÍDICO, EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA ENERGÉTICA - EMPRESA ELÉCTRICA QUITO - ECUADOR.”, sea publicado en la biblioteca virtual de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

Sangolquí, Mayo de 2014



Daniela Elizabeth Cargua Caiza

## **DEDICATORIA**

A mis padres que han sido el pilar fundamental en mi vida, quienes con sus palabras de aliento y su incondicional apoyo permitieron que este sueño se haga realidad.

Daniela Elizabeth Cargua Caiza

## **AGRADECIMIENTO**

A DIOS por darme sabiduría, entendimiento y salud para poder culminar meta en mi vida.

A mis padres, que con amor, comprensión e infinita paciencia, siempre me apoyaron en todos mis proyectos de vida.

A mi enamorado por su apoyo, comprensión y amor.

Al Director y Codirector de Proyecto, por sus conocimientos impartidos y por las recomendaciones para el desarrollo de esta Investigación, gracias, por ser unos grandes maestros.

A la Corporación para la Investigación Energética (CIE) y a el Laboratorio de Biotecnología Energética (BIOTEC), por el apoyo y la confianza.

Daniela Elizabeth Cargua Caiza

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>CERTIFICACIÓN.....</b>	<b>ii</b>
<b>DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD .....</b>	<b>iii</b>
<b>AUTORIZACIÓN .....</b>	<b>iv</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>v</b>
<b>AGRADECIMIENTO.....</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO .....</b>	<b>vii</b>
<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTADO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS .....</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xvii</b>
<b>CAPÍTULO 1 : INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Formulación del problema .....	1
1.2 Justificación .....	2
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 Objetivo general del proyecto .....	3
1.3.2 Objetivos específicos del proyecto.....	3
1.4 Marco teórico .....	4
1.4.1 Generalidades de las microalgas .....	4
1.4.2 Genero <i>Chlorella</i> .....	6
1.4.3 Parámetros de cultivo .....	9
1.4.3.1 Luz.....	9
1.4.3.2 Dióxido de Carbono .....	10
1.4.3.3 Nutrientes y medios de cultivo .....	10
1.4.3.4 Salinidad.....	12
1.4.3.5 Temperatura .....	12

1.4.3.6 Agitación del medio.....	13
1.4.4 Sistemas de cultivo .....	13
1.4.4.1 Sistemas abiertos .....	13
1.4.4.2 Fotobiorreactores.....	14
1.4.5 Cosecha de la biomasa .....	14
1.4.5.1 Filtración .....	15
1.4.5.2 Coagulación-Floculación.....	15
1.4.5.3 Sedimentación por gravedad .....	16
1.4.5.4 Centrifugación.....	16
1.4.6 Lípidos de microalgas .....	16
1.4.6.1 Biosíntesis de lípidos en microalgas .....	17
1.4.6.2 Perfil Lipídico .....	19
1.4.6.3 Aplicaciones biotecnológicas de los lípidos de <i>Chlorella</i> sp. ....	20
1.4.6.3.1 Producción de biocombustibles.....	20
1.4.6.3.2 Suplementos alimenticios .....	21
1.4.7 Métodos de cultivo para aumentar la productividad de las microalgas .....	21
1.4.7.1 Estrés en la acumulación de lípidos .....	22
1.4.7.1.1 Cultivo en dos etapas.....	22
1.4.7.2 Efecto del suministro de nitrógeno .....	23
1.4.7.3 Cambios bioquímicos de las microalgas en la deficiencia de nitrógeno .....	24
1.5 Hipótesis.....	25
<b>CAPÍTULO 2 : METODOLOGÍA .....</b>	<b>26</b>
2.1 Participantes .....	26
2.2 Zona de estudio .....	26
2.3 Periodo de investigación .....	26
2.4 Diseño Experimental.....	27
2.4.1 Aislamiento e Identificación de <i>Chlorella</i> sp. ....	27
2.4.2 ETAPA 1: Desarrollo de la biomasa de <i>Chlorella</i> sp. ....	27



2.4.2.1 Evaluación de los medios de cultivo .....	27
2.4.3 ETAPA 2: Estrés de nitrógeno .....	28
2.5 Procedimientos .....	29
2.5.1 Colecta de muestra .....	29
2.5.2 Aislamiento e identificación de <i>Chlorella</i> sp. ....	30
2.5.3 ETAPA 1: Desarrollo de la biomasa de <i>Chlorella</i> sp. ....	32
2.5.3.1 Evaluación de los medios de cultivo en el crecimiento de <i>Chlorella</i> sp.....	32
2.5.3.1.1 Determinación del valor de inóculos para los ensayos .....	32
2.5.3.1.2 Evaluación de los medios de cultivo.....	33
2.5.3.1.3 Parámetros de crecimiento .....	34
2.5.3.2 Escalamiento del cultivo de <i>Chlorella</i> sp. ....	35
2.5.3.3 Cosecha y lavado de la biomasa .....	38
2.5.3.4 Productividad de la biomasa .....	39
2.5.4 ETAPA 2: Estrés de nitrógeno en <i>Chlorella</i> sp.....	40
2.5.4.1 Cosecha y secado de la biomasa .....	40
2.5.5 Perfil Lipídico .....	41
2.6 Análisis de datos.....	42
<b>CAPÍTULO 3 : RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
3.1 Aislamiento e identificación de <i>Chlorella</i> sp. ....	43
3.2 ETAPA 1: Desarrollo de la biomasa de <i>Chlorella</i> sp. ....	44
3.2.1 Evaluación de los medios de cultivo en el crecimiento de <i>Chlorella</i> sp.....	45
3.2.2 Parámetros cinéticos del crecimiento de la microalga <i>Chlorella</i> sp.....	49
3.2.2.1 Velocidad de crecimiento .....	49
3.2.3 Productividad de la biomasa .....	52
3.3 ETAPA 2: Estrés nutricional de nitrógeno en <i>Chlorella</i> sp.....	53
3.3.1 Contenido lipídico de los tratamientos sometidos a limitaciones de nitrógeno. ....	53

3.4 Perfil Lipídico: ETAPA 1 y 2 .....	56
<b>CAPÍTULO 4 : DISCUSIÓN .....</b>	<b>59</b>
4.1 Aislamiento e identificación de <i>Chlorella</i> sp. ....	59
4.2 ETAPA 1: Medio de cultivo idóneo en el crecimiento de <i>Chlorella</i> sp.....	60
4.2.1 Productividad de la biomasa .....	62
4.3 ETAPA 2: Estrés nutricional de nitrógeno en <i>Chlorella</i> sp.....	63
4.4 Perfil Lipídico: ETAPA 1 y 2 .....	65
<b>CAPÍTULO 5 : CONCLUSIONES.....</b>	<b>68</b>
<b>CAPÍTULO 6 : RECOMENDACIONES .....</b>	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO 7 : BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>72</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> <i>Chlorella</i> sp. forma elipsoidal, 5µm de diámetro.....	7
<b>Figura 1.2</b> Biosíntesis de lípidos en microalgas .....	18
<b>Figura 1.3</b> Cambios bioquímicos en las microalgas debido a las limitaciones de nitrógeno. ....	25
<b>Figura 2.1</b> Sitio de colecta del efluente para el aislamiento.....	30
<b>Figura 2.2</b> Métodos de aislamiento de <i>Chlorella</i> sp. a) método de diluciones seriadas, b) método en cajas en medio sólido. ....	31
<b>Figura 2.3</b> Cultivo de <i>Chlorella</i> sp. para evaluar la cinética de crecimiento en medio Chu #10, Bold Basal y BG11.....	34
<b>Figura 2.4</b> Escalamiento del cultivo de <i>Chlorella</i> sp. a 200 mL en medio Chu #10. ....	36
<b>Figura 2.5</b> Escalamiento del cultivo de <i>Chlorella</i> sp. a 500 mL en medio Chu #10. ....	37
<b>Figura 2.6</b> Escalamiento del cultivo de <i>Chlorella</i> sp. a fotobioreactores de 15 L c/u.....	38
<b>Figura 2.7</b> Separación de medio líquido y sólidos (biomasa de <i>Chlorella</i> sp.) mediante un tamiz.....	39
<b>Figura 2.8</b> Etapa 2, estrés nutricional de nitrógeno, fotobioreactores de 2 L de capacidad, colocados al azar. ....	40
<b>Figura 2.9</b> Cosecha de la biomasa a) floculación con sulfato de aluminio 1g L <sup>-1</sup> , de los ensayos con disminución de nitrógeno en el medio, b) secado de la biomasa para el posterior análisis. ....	41

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1</b> Contenido de proteína, carbohidratos y lípidos en las microalgas.	5
<b>Tabla 1.2</b> Comparación de la productividad de microalgas.....	8
<b>Tabla 1.3</b> Medios de cultivo.....	12
<b>Tabla 2.1</b> Aleatorización de las unidades experimentales de la etapa.....	28
<b>Tabla 2.2</b> Descripción de los tratamientos de la fase 2.....	28
<b>Tabla 2.3</b> Ácidos grasos presentes en el perfil lipídico. ....	42
<b>Tabla 3.1</b> Características en la identificación de <i>Chlorella</i> sp. según claves taxonómicas. ....	43
<b>Tabla 3.2</b> Resumen del análisis de varianza de la densidad celular con diferentes medios de cultivo. ....	47
<b>Tabla 3.3</b> Diferencia de medias que determina el medio de cultivo que favorece el crecimiento de <i>Chlorella</i> sp.....	48
<b>Tabla 3.4</b> Análisis de varianza para la variable velocidad de crecimiento. ....	49
<b>Tabla 3.5</b> Análisis de medias de la variable velocidad de crecimiento. ....	49
<b>Tabla 3.6</b> Análisis de varianza para la variable tiempo de duplicación (días). ....	50
<b>Tabla 3.7</b> Análisis de medias de la variable tiempo de duplicación.....	50
<b>Tabla 3.8</b> Resumen de los parámetros cinéticos en diferentes medios de cultivo. ....	51
<b>Tabla 3.9</b> Productividad de la biomasa de cada uno de los bioreactores.....	53
<b>Tabla 3.10</b> Contenido lipídico de <i>Chlorella</i> sp. obtenidas en las diferentes concentraciones de nitrógeno limitantes.....	54
<b>Tabla 3.11</b> Análisis de varianza de los tratamientos sometidos al estrés de nitrógeno. ....	55

<b>Tabla 3.12</b> Análisis de medias que determina el tratamiento que favorece la acumulación de lípidos en <i>Chlorella</i> sp.....	55
<b>Tabla 3.13</b> Composición de ácidos grasos de la microalgas <i>Chlorella</i> sp. en las etapas 1 y 2. ....	57

## LISTADO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

<b>TAGs</b>	Triacilgliceridos
<b>GL</b>	Glicolípidos
<b>PL</b>	Fosfolípidos
<b>SAFA</b>	Ácidos grasos saturados
<b>MUFAs</b>	Ácidos grasos moniinsaturados
<b>PUFAs</b>	Ácidos grasos poliinsaturados
<b>UFAs</b>	Ácidos grasos insaturados
<b>EEQ</b>	Empresa Eléctrica Quito
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfatos
<b>Pi</b>	Ortofosfato
<b>μE</b>	Microeinsteins
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>°C</b>	Grado centígrado
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>G3P</b>	Glicerol-3-fosfato
<b>LPA</b>	Lisofosfátido
<b>PA</b>	Fosfatidato
<b>DGAT</b>	Diacilglicerolacil-transferasa
<b>PAP</b>	Ácido fosfatídico fosfatasa
<b>GPAT</b>	Glicerol-sn-3-fosfato acil-transferasa
<b>BBM</b>	Medio Bolds Basal

<b><math>\mu</math></b>	Velocidad de crecimiento
<b>Td</b>	Tiempo de duplicación
<b>gL</b>	Grados de libertad
<b>Cél</b>	Células
<b>d</b>	Días
<b>h</b>	horas
<b><math>\mu\text{m}</math></b>	micromol
<b>C16:0</b>	Ácido palmítico
<b>C16:1</b>	Ácido palmitoleico
<b>C18:1n9 cis <math>\omega</math>9</b>	Ácido oleico
<b>C18:2n6 cis <math>\omega</math>6</b>	Ácido linoléico
<b>C20:2</b>	Ácido cis-11,14 eicosadienoico

## RESUMEN

En la presente investigación se evaluó el efecto de la disminución de nitrógeno en la acumulación de lípidos de la microalga *Chlorella* sp. nativa, aislada del reservorio de agua de la Empresa Eléctrica Quito, Cumbaya; para lo cual se efectuaron dos etapas. En la primera se probó tres medios de cultivo Chu#10, BG-11 y Bold Basal para incrementar la biomasa. Se estableció que el medio de cultivo que presentó mayor densidad celular ( $1.74 \times 10^7$  células\*mL<sup>-1</sup>) y velocidad específica de crecimiento ( $0.894$  día<sup>-1</sup>), fue el medio Chu#10. En la siguiente etapa, la biomasa fue sometida a déficit de nitrógeno durante 15 días, reduciendo el nitrato de calcio del medio Chu#10 en un 100 % (T5), 75 (T4), 50 (T3), 25 (T2) y 0 (T1). El T1 fue el que mayor porcentaje de lípidos acumuló en comparación a los demás tratamientos. El perfil lipídico y el contenido de lípidos totales, se realizaron al inicio y al final del estrés, dando como resultado una disminución del porcentaje de lípidos que fue de 5.99 a 2.15%, al someterles a estrés. En el perfil lipídico en la etapa 1 se observó, que los ácidos grasos que se encuentran en mayor cantidad, fueron los ácidos grasos insaturados en un 78%. En la etapa 2, mayoritariamente se presentó los ácidos grasos saturados en un 79.8%. La disminución de las concentraciones de nitrógeno en el medio de cultivo no favoreció la acumulación de lípidos en la microalga *Chlorella* sp. nativa. Sin embargo el cambio en el perfil lipídico de los ácidos grasos saturados, beneficia a la aplicación de estos como materia prima para la elaboración de biocombustibles.

### PALABRAS CLAVES:

- **MICROALGAS**
- *Chlorella* sp.
- **LÍPIDOS**
- **DISMINUCIÓN DE NITRÓGENO**



## ABSTRACT

In the present investigation was evaluated the effect of decreasing nitrogen lipid accumulation in the microalgae *Chlorella* sp. native, isolated from the water reservoir Empresa Eléctrica Quito Cumbaya; for which two steps were carried out. In the first, was tested three culture media Chu # 10, BG-11 Basal Bold and for increase the biomass. It was established that the culture medium showed higher cell density (cells  $1.74 \times 10^7 \text{ * mL}^{-1}$ ) and specific growth rate ( $0.894 \text{ day}^{-1}$ ), was the culture medium Chu # 10. In the next step, the biomass was subjected to nitrogen deficiency for 15 days, reducing calcium nitrate in the medium Chu # 10 in 100 % (T5), 75 (T4), 50 (T3), 25 (T2) and 0 (T1). The T1 was the highest lipid accumulation compared to the other treatment. The lipid profile and total lipid content were performed at the beginning and end of the stress, resulting in a decrease of lipid content was 5.99 to 2.15%, by subjecting them to stress. Lipid profile in step 1 was observed 78% unsaturated fatty acids. In step 2, they showed mainly 79.8% fatty acid. The lower concentrations of nitrogen in the culture medium did not favored the accumulation of lipids in the microalgae *Chlorella* sp. native. However, the change in the lipid profile of saturated fatty acids, benefit the application of these as raw material for the production of biofuels.

### KEYWORDS:

- **MICROALGAE**
- *Chlorella* sp.
- **LÍPIDS**
- **REDUCTION OF NITROGEN**

## **CAPÍTULO 1 : INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Formulación del problema**

En la última década la biotecnología de las microalgas, ha generado gran interés científico alrededor del mundo, ya que se intenta aprovechar su diversidad bioquímica en una amplia variedad de aplicaciones; como en la medicina, en la industria alimenticia, ambiental, cosmética y energética. En esta última es donde más atención se le está dando a las microalgas, ya que estas son la materia prima para el desarrollo de energías renovables.

El biodiesel a partir de microalgas constituye una de las más recientes fuentes de biocombustibles, ya que su principal componente son los lípidos entre ellos los triacilglicéridos (TAGs), ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glicolípidos (GL), fosfolípidos (PL) y pigmentos (Faife, Otero, & Alvarez, 2012). Estas microalgas para su crecimiento requieren de algunas condiciones óptimas como luz, nutrientes, temperatura, pH y muy importante el requerimiento de CO<sub>2</sub> que utilizan para su metabolismo (Córdova, 2012). A pesar de las muchas ventajas de la aplicación de los lípidos de las microalgas, se ha vuelto un gran desafío el desarrollo nuevas tecnologías y una producción económicamente viable en la producción de lípidos para biocombustibles.

La diversidad climática y las condiciones geográficas únicas del Ecuador, ha permitido que exista un gran diversidad biológica, por estas razones es necesario el estudio de las microalgas nativas, y su bioprospección. Para lo cual el Laboratorio de Biotecnología Energética, conjuntamente con el apoyo de la Corporación para la Investigación Energética y la Empresa Eléctrica Quito, tiene como principal objetivo la producción de biocombustibles de

tercera generación a partir de microalgas aisladas en diferentes ambientes acuáticos del Ecuador.

La presente investigación tiene como propósito evaluar la disminución en las concentraciones de nitrógeno en un cultivo de la microalga *Chlorella* sp, para la acumulación de lípidos en el Laboratorio de Biotecnología Energética de la Empresa Eléctrica Quito. Siendo un gran aporte a las investigaciones en el Ecuador, y en el desarrollo de nuevas estrategias para poder aumentar la rentabilidad de la producción de los lípidos a escala industrial.

## **1.2 Justificación**

En los últimos años, las microalgas han tenido mucha atención en la investigación de la biotecnología, por sus múltiples compuestos de interés comercial, industrial o energético, tales como los pigmentos, polisacáridos, proteínas y lípidos. Con el estudio de estos microorganismos, los procesos de síntesis y los sistemas de cultivos; lo que se pretende es aprovechar la capacidad fotosintética para generar productos de valor económico, además se contribuye a mitigar las emisiones de CO<sub>2</sub> proveniente de procesos industriales.

Los lípidos producidos por las microalgas principalmente los ácidos grasos son los preferidos para la mayoría de las aplicaciones. Estos lípidos son utilizados en la elaboración de aceites comestibles, en la industria cosmética, en la medicina y principalmente son ideales para la producción de biodiesel, debido a su alto contenido de triglicéridos.

En la microalga *Chlorella* sp. se ha registrado una acumulación de lípidos en su membrada de un 28 a 32% de su masa en base seca. Sin embargo el contenido de lípidos puede ser controlado en función de las condiciones de

cultivo, principalmente mediante la limitación de nutrientes (Ratledge, 2002). Para aumentar la rentabilidad de la utilización de las microalgas como fuente de lípidos se ha desarrollado estrategias, que permitan que estas células puedan sintetizar mayor cantidad de este producto de interés. Siendo el más destacado la limitación de nitrógeno, ya que además de promover la producción de lípidos, también estimula la acumulación en cuerpo de aceites (Hu, y otros, 2008).

En el Ecuador no existen investigaciones publicadas sobre la inducción a la acumulación de lípidos por un estrés fisiológico utilizando *Chlorella* nativa aislada del efluente proveniente del reservorio de la empresa eléctrica Quito (EEQ) Cumbaya. El estudio de una microalga nativa resulta interesante ya que puede tener distintas adaptabilidades que una microalga comercial por las condiciones propias del sitio.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo general del proyecto**

Evaluar la disminución de nitrógeno para un cultivo de *Chlorella* sp. nativa y su efecto sobre el contenido lipídico, en el Laboratorio de Biotecnología Energética - Empresa Eléctrica Quito - Ecuador.

#### **1.3.2 Objetivos específicos del proyecto**

- Aislar la microalga *Chlorella* sp. proveniente del reservorio de agua de la Empresa Eléctrica Quito (EEQ) - Cumbaya.
- Seleccionar entre BG-11, Chu #10 y Bold basal como medio de cultivo que presente mayor densidad celular de la microalga *Chlorella* sp. nativa.

- Determinar la concentración de nitrógeno que favorece la acumulación de lípidos en la microalga *Chlorella* sp. nativa.
- Determinar la productividad de la biomasa y el contenido de lípidos de la microalga *Chlorella* sp. sometidas a concentraciones limitantes de nitrógeno.
- Analizar el perfil lipídico de la concentración de nitrógeno que favorece la acumulación de lípidos en la microalga *Chlorella* sp. nativa.

## **1.4 Marco teórico**

### **1.4.1 Generalidades de las microalgas**

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos, eucariotas; son un grupo muy heterogéneo en términos de tamaño, forma, función ecológica y adaptabilidad a diversos ambientes (Córdoba, 2012). Son considerados los primeros microorganismos fotosintéticos en el planeta, y se encuentra en la base de la cadena trófica, siendo los principales formadores de materia orgánica por tal motivo son esenciales en la vida de los océanos. Estos microorganismos al igual que las plantas, convierten la energía solar en energía química mediante la fotosíntesis, sin embargo su eficiencia de transformación es cuatro veces superior (Abalde & Herrero, 2004).

La facilidad de adaptación de las microalgas a muchos hábitats es diversa, se encuentran por ejemplo en aguas marinas, dulces, termales, residuales y salobres. Además pueden crecer en superficies solidas como sobre la tierra, en rocas y sobre suelo del desierto (Garibay, Vasquez, Sánchez, Serrano, & Martínez, 2009).

Los componentes principales de las microalgas son las proteínas, los lípidos y carbohidratos, además contienen una gran variedad de vitaminas y compuestos inorgánicos como yodo, potasio, hierro, magnesio, calcio, entre otros, dependiendo de la naturaleza de la microalga (ver tabla 1.1). La composición puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo, algunas Chlorophytas muestran la composición bioquímica típica de 30-50% de proteínas, 20-40% de hidratos de carbono y 8-15% de lípidos en óptimas condiciones ambientales (Dávila, 2013).

**Tabla 1.1** Contenido de proteína, carbohidratos y lípidos en las microalgas.

<b>Cepa</b>	<b>Proteína (%)</b>	<b>Carbohidratos (%)</b>	<b>Lípidos (%)</b>
<b>Algas de agua dulce</b>			
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1.9
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	22-38
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14

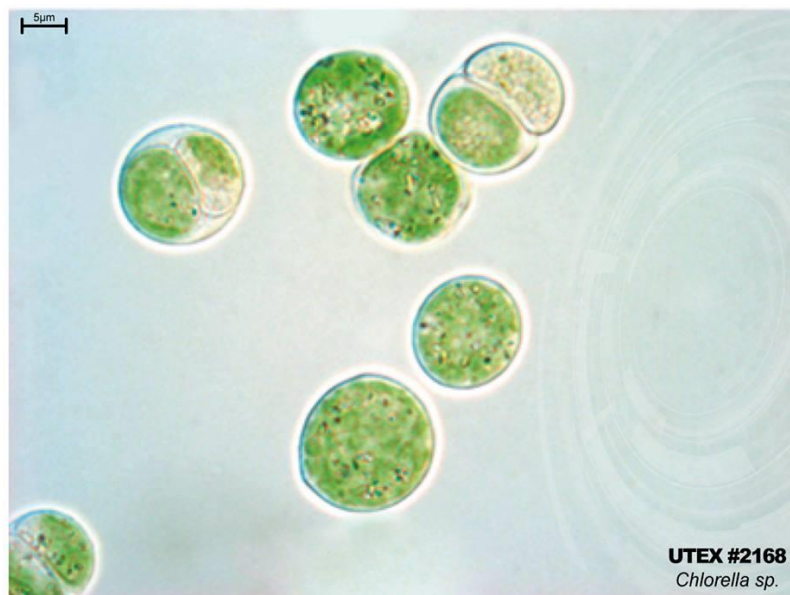
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Spirulina máxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7

---

Fuente: (AlgaeLink, 2010)

#### 1.4.2 Genero *Chlorella*

El género *Chlorella* proviene del griego Chloros, que significa verde, y del latín ella, que significa cosa pequeña, fue nombrada así por el Holandés M. W. Beyerinck en 1890. Pertenece a la división Chlorophyta y a la clase Chlorophyceae, se caracteriza principalmente por su rápido crecimiento y su gran adaptabilidad a diversos factores de crecimiento. Tiene una forma es elipsoidal, y tiene un diámetro aproximado de 3 a 12  $\mu\text{m}$  (Alvear , Castillo , & Henao, 2011). Presenta un color verde intenso por la presencia de clorofila, por esta razón posee la capacidad de realizar fotosíntesis y multiplicarse en cuatro células cada 20 horas (Albarracín , 2007).



**Figura 1.1** *Chlorella* sp. forma elipsoidal, 5 $\mu$ m de diámetro.

Fuente: (UTEX The culture Collection of Algae, 2014)

El contenido de ácidos grasos del genero *Chlorella* está compuesto principalmente por ácido oleico, linoleico, palmítico y esteárico. La composición de *Chlorella* es 23-63 % de lípidos, proteínas 36 % y 41 % de hidratos de carbono, estos resultados muestran que las especies de *Chlorella* son adecuadas para varias aplicaciones en la industria alimenticia, cosmética y energética, como en la producción de biocombustibles (Armendáriz, 2011).



**Tabla 1.2** Comparación de la productividad de microalgas

Especies de microalgas	Rendimiento (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	
	Biomasa	Lípidos
<i>Botryococcus braunii</i>	0.16	0.029-0.064
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	N/A	0.02214
<i>Chlorella emersonii</i>	0.25	0.157
<i>Chlorella minutissima</i>	0.16	0.0912
<i>Chlorella vulgaris</i>	0.37	0.148
<i>Chlorella protothecoides</i>	3.6-4.1	1.6-1.7
<i>Isochrysis galbana</i>	N/A	0.0207
<i>Nannochloropsis sp.</i>	0.3	0.204
<i>Neochloris oleoabundans</i>	0.09	0.0261
<i>Schizochytrium limacinum</i>	1.88	1.38
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.15	0.27

Fuente: (Suali & Sarbatly, 2012)

La tabla 1.2 muestra las tendencias actuales de especies de microalgas para la producción de lípidos está a favor del genero *Chlorella*, específicamente *C. emersonii*, *C. minutissima*, *C. vulgaris* y *C. protothecoides* (Suali & Sarbatly, 2012).

### **1.4.3 Parámetros de cultivo**

El cultivo de microalgas se refiere al crecimiento y proliferación de estos microorganismos, controlando los parámetros de cultivo según el requerimiento de las especies y del interés que se le dé a los metabolitos que producen las microalgas.

Las microalgas requieren de condiciones y factores para su óptimo desarrollo. Las microalgas completamente autótrofas, requieren para el crecimiento de: luz, agua, dióxido de carbono, nutrientes, ya que estas microalgas a través de la fotosíntesis son capaces de sintetizar todos los compuestos bioquímicos necesarios para su desarrollo. El crecimiento de las microalgas se ve regulado por parámetros como: la calidad y cantidad de nutrientes, la luz, el pH, la agitación y mezcla, salinidad y la temperatura (Salazar, 2012).

#### **1.4.3.1 Luz**

La luz es el parámetro fundamental para el crecimiento de las microalgas, ya que es la responsable de activar las reacciones fotosintéticas, las cuales producen el alimento para el crecimiento de estos microorganismos. Los aspectos importantes que se deben considerar son la intensidad o cantidad, la calidad espectral, y la necesidad de fotoperiodo, ya que estas características afectan el crecimiento y a la síntesis de compuesto orgánicos como lípidos, carbohidratos, proteínas, entre otros (Portilla, 2010).

La luz demasiado intensa puede provocar foto-inhibición, por esta razón los sistemas de cultivos de microalgas son poco profundos lo cual optimiza la captura de luz suficiente; a menudo se emplean intensidades de luz entre 100

y  $200 \mu\text{E sec}^{-1} \text{ m}^{-1}$  correspondientes a un 5-10% de plena luz del día de  $2000 \mu\text{E sec}^{-1} \text{ m}^{-1}$  (Salazar, 2012).

#### **1.4.3.2 Dióxido de Carbono**

Las microalgas como todos los organismos fotosintéticos utilizan el  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono para su crecimiento, ya que la falta de este limita la productividad de un cultivo. La solubilidad del  $\text{CO}_2$  en el agua no es suficiente, este aspecto se podría mejorar mediante el burbujeo de aire a través del agua (Salazar, 2012).

El dióxido de carbono sólo es necesario durante el día pues de noche es producido debido a la respiración de las microalgas, como todos los organismos aeróbicos, una alternativa posible es la disolución de  $\text{CO}_2$  de los gases de combustión a la concentración máxima en la noche, y agregar esta agua para el sistema de cultivo durante el día (Salazar, 2012).

#### **1.4.3.3 Nutrientes y medios de cultivo**

Los nutrientes en los cultivos de microalgas juegan un rol muy importante ya que son esenciales para el correcto desarrollo y crecimiento celular. Los nutrientes pueden dividirse en macronutrientes, micronutrientes y vitaminas (Alvear , Castillo , & Henao, 2011).

El nitrógeno es un elemento importante para el crecimiento de las microalgas, el cual puede ser añadido en forma de amonio o nitratos disueltos en el medio. El nitrógeno forma parte de los ácidos nucleicos y de las proteínas, además está directamente relacionado con el metabolismo primario (Sharma, Pal, & Sharma, 2011).

El fósforo otro componente importante en el crecimiento de las microalgas el cual interviene en la formación de enzimas, proteínas, polisacáridos, polinucleótidos, glicerolípidos, glicolípidos, fosfolípidos y otros componentes estructurales necesarios para el crecimiento y desarrollo normal de las microalgas. Además está involucrado en los procesos metabólicos celulares como la incorporación de ortofosfato (Pi) para la formación de nucleótidos trifosfatos (ATP) altamente energéticos, fosforilación oxidativa en las mitocondrias y el transporte de electrones (Ugalde, 2011).

El hierro es un oligoelemento esencial en la composición bioquímica celular debido a sus propiedades de óxido- reducción. Otros metales traza como el Magnesio, Calcio, Manganeso, Zinc, cobre y Molibdeno, suelen complementar el medio de cultivo para reforzar el crecimiento de las microalgas (Ugalde 2011).

En literatura nos describen una variedad de medios de cultivos dependiendo del crecimiento de las microalgas ya sea en agua dulce o agua de mar, y el requerimiento de algunos nutrientes específicos. En la tabla 1.3 podemos observar algunos medios utilizados en el cultivo de estos microorganismos.

**Tabla 1.3** Medios de cultivo.

Medios de Agua Dulce	Medios de Agua de Mar
Medio Bolds Basal	Medio de Walne
Medio BG-11	Medio F (Guillard y Ryther)
Medio Chu	Medio F-Modificado (solución concentrada)

Fuente: (Alvear , Castillo , & Henao, 2011).

#### 1.4.3.4 Salinidad

Otro factor importante en el crecimiento y desarrollo de las microalgas es la salinidad, cada microalga tiene un rango óptimo diferente, sin embargo puede aumentar por las condiciones de calor lo cual provoca evaporación y aumento en este factor. Los cambios en la salinidad pueden causar estrés osmótico, estrés iónico y los cambios de los ratios iónicos celulares debido a la permeabilidad selectiva de iones de la membrana de las microalgas (Salazar, 2011).

#### 1.4.3.5 Temperatura

La temperatura es un parámetro importante en el cultivo de microalgas ya sea en sistemas abiertos o cerrados, ya que muchas microalgas no pueden tolerar temperaturas por debajo de su óptimo (Alvear , Castillo , & Henao, 2011). Las microalgas de la especie *Chlorella* tienen la capacidad de vivir dentro un amplio rango de temperaturas que van desde 5 a 42 °C. Sin embargo las que no se encuentran en el rango óptimo pueden dejar de crecer y morir (Ruíz, 2011).

#### **1.4.3.6 Agitación del medio**

El medio de cultivo de microalgas debe tener una agitación constante ya que esta favorece la transferencia de masa, impide la sedimentación, que se forme incrustaciones en las paredes de recipiente, y además homogeneiza el pH, la luz y la distribución de los gases. Un flujo turbulento es de gran importancia en cultivos de alta densidad. Es importante saber que no todas las especies de microalgas toleran la agitación fuerte ya que pueden ser sensibles al estrés hidrodinámico además de dañar las células (Ruiz, 2011). La agitación nos garantiza que todas las células estén expuestas a la misma cantidad de luz y nutrientes lo que evita la estratificación térmica mejorando el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire (Salazar, 2012).

#### **1.4.4 Sistemas de cultivo**

Los sistemas de cultivo según su configuración y tipo de funcionamiento, se clasifican en sistemas abiertos (canales o estanques) y sistemas cerrados (fotobiorreactores).

##### **1.4.4.1 Sistemas abiertos**

Los sistemas de cultivo abiertos se han utilizado desde hace 50 años en la producción comercial de microalgas (Bermeo, 2011). Se clasifican en aguas superficiales naturales (estanques, lagunas y lagos) y estanques artificiales (tipo carrusel y raceway).

De los sistemas abiertos los más utilizados y eficientes son los raceway son de forma elipsoidal con una separación central los cuales permiten formar canales de poca profundidad en forma de circuito cerrado. La agitación se produce paletas giratorias y mecanismos para suministrar CO<sub>2</sub> y nutrientes,

este mezclado favorece la estabilización del crecimiento y productividad de las microalgas (Ruíz, 2011).

La producción mediante estanques es el método más económico en comparación con los fotobiorreactores, ya sea en inversión de construcción como de mantenimiento, además son de bajo consumo energético durante la etapa de funcionamiento. Sin embargo, también presenta algunas desventajas ya que requieren grandes extensiones de terreno, se produce pérdidas de agua por evaporación en climas calientes y pérdidas de CO<sub>2</sub> por difusión a la atmósfera y la contaminación con otros microorganismos (Bermeo, 2011).

#### **1.4.4.2 Fotobiorreactores**

Los sistemas de cultivo cerrados de microalgas, se refiere a reactores transparentes de plástico o vidrio, que permitían el paso de la luz; su forma puede ser tubulares, cilíndricas o planas (Bermeo, 2011).

Este tipo de cultivo tiene algunas ventajas como: facilidad de mantener un monocultivo, ya que se evita la contaminación de microorganismo de otras especies, lo cual permite la utilización de la biomasa como materia prima en la industria farmacéutica o alimentaria. También permiten el control de los parámetros de proceso, se evita la evaporación del medio y ocupa menos espacio que los sistemas cerrados (Ruíz, 2011).

#### **1.4.5 Cosecha de la biomasa**

Para la recuperación de la biomasa es un proceso de dos fases, que consiste en: a) la separación de la biomasa en suspensión, se puede utilizar métodos como la floculación o sedimentación por gravedad y b) el

espesamiento de la biomasa, que consiste en concentrar la mezcla mediante métodos como la centrifugación, filtrado y ultrasonido (Albarracín, 2007). Para la elección de la técnica de cosecha se debe tener en cuenta las características de las microalgas, por ejemplo, tamaño, densidad, y el destino de los productos (Bermeo, 2011).

La cosecha de las microalgas representa al menos el 20-30% del coste total de producción, ya que es una etapa de alto consumo de energía. (Albarracín, 2007).

#### **1.4.5.1 Filtración**

La filtración permite la recuperación de la biomasa de especies de microalgas de un tamaño mayor a 70  $\mu\text{m}$ , este método se complementa utilizando bombas de succión. Para microalgas menores de 30  $\mu\text{m}$  se aplica la microfiltración o ultrafiltración con membranas, estos métodos se aplican siempre y cuando los volúmenes del cultivo sean de aproximadamente 2  $\text{m}^3 \text{ día}^{-1}$  o menores (Bermeo, 2011).

#### **1.4.5.2 Coagulación-Floculación**

Este método consiste en adicionar al cultivo de microalgas productos químicos conocidos como floculantes, los cuales neutralizan las cargas negativas que poseen las membranas exteriores de las microalgas, lo cual provoca su agregación facilitando una sedimentación más rápida (Ruíz, 2011). Estos floculantes no afectan la composición ni la toxicidad del cultivo, siempre y cuando se tengan en cuenta la dosis aplicada, el pH del medio, el tiempo de agitación, y la especie de microalga (Bermeo, 2011).



Los floculantes pueden ser de origen orgánico e inorgánico como el sulfato de aluminio, cloruro férrico, sulfato férrico, y el quitosan (Bermeo, 2011).

#### **1.4.5.3 Sedimentación por gravedad**

Este método es más empleado para separar las microalgas en el agua y aguas residuales. La eficiencia de este método depende de tamaño y la densidad de las microalgas. Sin embargo la desventaja principal es que es un método muy lento. La aplicación de pretratamiento como el ultrasónico han demostrado que optimizan la eficiencia de agregación del cultivo (Bermeo, 2011).

#### **1.4.5.4 Centrifugación**

La centrifugación consiste en separar la parte sólida de la líquida, mediante una fuerza rotativa, donde se separa debido a la diferencia de densidades. Este método es utilizado cuando la biomasa está destinada para la industria alimenticia o farmacéutica. Sin embargo el principal inconveniente es el elevado consumo energético y el peligro de dañar las células debido al esfuerzo cortante (Bermeo, 2011).

#### **1.4.6 Lípidos de microalgas**

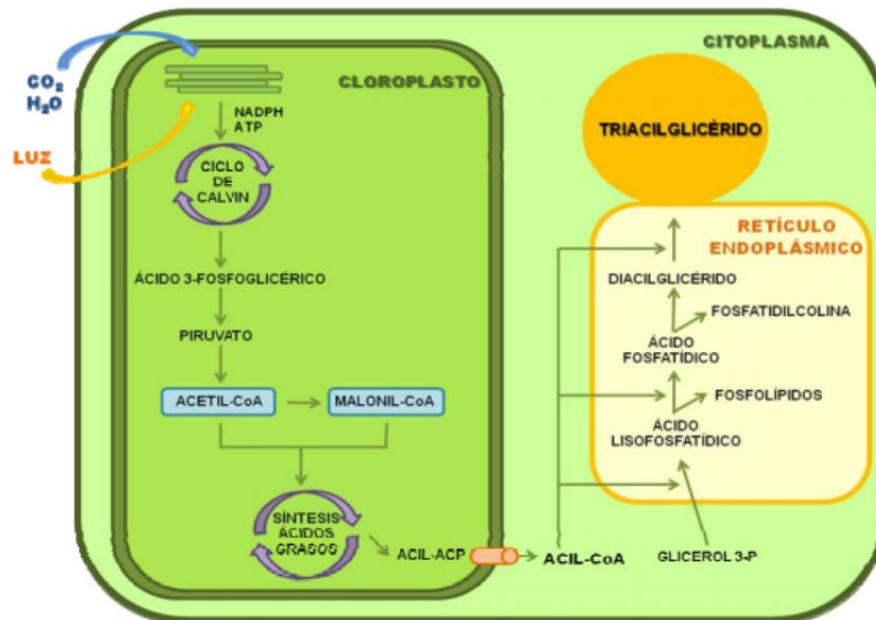
Unos de los componentes principales de la microalgas son los lípidos, los cuales están ubicados en las membranas celulares y constituyen productos de almacenamiento de energía. Algunas cepas naturalmente, poseen altos porcentajes en su contenido lipídico (entre 20 y 50% de su peso seco). Sin embargo se puede aumentar estos valores optimizando los factores que determinan el crecimiento como: el nivel de nutrientes específicamente el nitrógeno, la intensidad de la luz, concentraciones de CO<sub>2</sub> y el proceso de

cosecha. El incremento de la acumulación de lípidos, no significa que aumentara la productividad de lípidos, productividad de biomasa y acumulación de lípidos, ya que no se encuentran correlacionados (Markou & Nerantzis, 2013).

La productividad lipídica tiene en cuenta la concentración de lípidos en las células y la biomasa producida; estos datos son esenciales puesto que son considerados como un indicadores de los costos de producción (Brennan & Owende, 2010), tanto para la producción de biodiesel como para ácidos grasos de interés alimentario.

#### **1.4.6.1 Biosíntesis de lípidos en microalgas**

Las microalgas realizan la fotosíntesis para la producción de su alimento, los productos de la fotosíntesis son el NADPH y ATP los cuales actúan como sustrato inicial en el ciclo de Calvin, donde interviene la enzima Rubisco catalizando la conversión de CO<sub>2</sub> y ribulosa-5-fosfato en dos triosas, las cuales posteriormente son convertidas en piruvato y acetil-CoA.



**Figura 1.2** Biosíntesis de lípidos en microalgas

Fuente: (Garibay, Vásquez, Sánchez, Serrano, & Martínez, 2009)

Dentro del cloroplasto las moléculas de acetil-CoA son carboxiladas por acetil-CoAcarboxilasa para la síntesis de malonil-CoA, esta molécula es transferida a la proteína transportadora de grupos acil del complejo multi-enzimático sintasa de ácidos grasos; donde la subunidad cetoacil-ACP sintasa cataliza la condensación de malonil-ACP mediante tres reacciones cíclicas: reducción, deshidratación y reducción; condensando el producto con otra molécula de malonil-CoA. Este 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.

La síntesis de triacilgliceroles se efectúan en el retículo endoplásmico, donde se dan origen a los lípidos neutros con el propósito de almacenar energía y liberar espacio dentro de la célula. La primera reacción para la

síntesis de triacilglicerol (TAGs) es la condensación 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). Posteriormente, PA puede ser desfosforilado por la enzima ácido fosfatídico fosfatasa (PAP) para formar diacilglicerol. Finalmente, la síntesis de TAGs 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.

#### **1.4.6.2 Perfil Lipídico**

La composición de los lípidos y ácidos grasos en las microalgas, pueden ser influenciados por factores como luz, temperatura, concentración de la fuente de nitrógeno y de dióxido de carbono.

La temperatura tiene un efecto importante en la composición de los ácidos grasos de las microalgas, ya que las bajas temperaturas incrementan el grado de insaturación. La intensidad lumínica es otro parámetro que afecta el perfil lipídico, ya que altas cantidades de luz favorecen la acumulación de triglicéridos con un elevado grado de saturación, e intensidades bajas promueven la síntesis de lípidos polares altamente insaturados asociados a las membranas. En cultivos sometidos a limitaciones de nitrógeno, mostraron una inclinación por la síntesis de ácidos grasos saturados y monoinsaturados; y por el contrario disminuyeron el contenido de ácidos poliinsaturados (Arias , Martínez, & Cañizares , 2013). El tipo y cantidad de lípidos producidos también dependen de la especie y de la magnitud del cambio de estas variables (Faife, Otero, & Alvarez, 2012).

Para *Chlorella vulgaris*, bajo condiciones fotoautotróficas y fotoheterotróficas, la disminución del nitrógeno en el medio de cultivo tiene un importante papel en la acumulación de los ácidos grasos palmítico y oleico y la disminución los ácidos grasos poliinsaturados. En condiciones mixotróficas el perfil lipídico registra la presencia del ácido palmítico y ácido oleico (50-62%) independiente de la concentración de nitrógeno en el medio (Rodolfi, Chini, Padovani, Biondi, & Bonini, 2009).

#### **1.4.6.3 Aplicaciones biotecnológicas de los lípidos de *Chlorella* sp.**

En la actualidad se han centrado las investigaciones biotecnológicas en dar valor a los metabolitos que las microalgas producen. Los lípidos se destacan ya que poseen varias aplicaciones las cuales se presentan a continuación.

##### **1.4.6.3.1 Producción de biocombustibles**

Los biocombustibles a partir de la biomasa de las microalgas han surgido como una alternativa viable debido al agotamiento de los combustibles fósiles y a las múltiples ventajas que presentan como: las altas tasas de crecimiento, su alta eficiencia fotosintética, son biodegradables y renovables (Markou & Nerantzis, 2013). El género *Chlorella* se destaca en la producción de biocombustible ya que pueden acumular altas cantidades de lípidos (50-60%). El contenido lipídico son especialmente de triglicéridos (TG) no polares, ricos en ácidos grasos saturados y monoinsaturados resultan ideales para la producción de biodiesel (Arias , Martínez, & Cañizares , 2013)

#### **1.4.6.3.2 Suplementos alimenticios**

Las microalgas son también una fuente de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales suministran estos componentes esenciales para el ser humano ya que carecemos de las enzimas necesarias para sintetizarlos. La principal fuente de PUFAs en la actualidad es el aceite de pescado, sin embargo su aplicación como aditivos está limitada por la posible acumulación de toxinas, el olor a pescado y su sabor desagradable. Por esta razón se destaca la utilización de los lípidos de microalgas como fuente de PUFAs, siendo los más importantes, el ácido docohexanoico (DHA), el ácido eicosapentanoico (EPA) y el omega 3. El DHA y el EPA se utilizan como suplemento en fórmulas infantiles y dietas, siendo esencial para el funcionamiento apropiado del cerebro adulto, y para el desarrollo del sistema nervioso y habilidades visuales durante en los primeros meses de vida (Santos, González, & Martín, 2014).

#### **1.4.7 Métodos de cultivo para aumentar la productividad de las microalgas**

El enfoque que se le da a un cultivo de microalgas es de mucha importancia ya que al menos el 25% del rendimiento de la energía puede ser recupera en el proceso de producción de los biocombustibles. Se puede manipular algunas condiciones del cultivo como por ejemplo la adición suficiente o insuficiente de nitrógeno durante un cierto ciclo, para que se acumule altos contenidos de lípidos en las células, además el costo de la producción puede ser reducido aplicando estas alternativas en los métodos de cultivo de las microalgas (Panchaa, y otros, 2014).

Una alternativa para reducir costos en la elaboración de biocombustibles a partir de microalgas es mediante el aumento de los lípidos, lo cual se puede lograr utilizando dos técnicas como son: la manipulación del sistema de cultivo

en términos de ingeniería y diseño, y cambiando el metabolismo ficológico de las células de las microalgas. Estas técnicas pueden aumentar la biomasa y la tasa de producción de lípidos en más de 10 veces. El enfoque ficológico, consiste en un cultivo en dos etapas que puede ser manipulado para aumentar la producción de lípidos ( Farooq, y otros, 2013).

#### **1.4.7.1 Estrés en la acumulación de lípidos**

El rendimiento de la biomasa y la composición bioquímica de las microalgas pueden ser modificadas fácilmente cambiando compuestos del medio de cultivo y condiciones ambientales para obtener un rendimiento más alto de biomoléculas deseables. Los lípidos y los hidratos de carbono en las microalgas pueden aumentar por estímulos químico como el estrés de nitrógeno, fosfato y salinidad o por estímulos físicos como el cambio en el pH en el cultivo, la temperatura y la intensidad de la luz o fotoperiodo. El estímulo más destacado para la acumulación de lípidos es el estrés por limitaciones de nitrógeno, sin embargo esto perjudica la productividad de la biomasa.

Para mitigar este problema se utiliza un cultivo en 2 etapas, consiste en que la microalga se cultiva primero en condiciones ricas de nitrógeno y después se transfiere a un medio libre de nitrógeno el cual proporciona un alto contenido de lípidos, con la pérdida de biomasa insignificante en muchas especies de microalgas (Cha, Chen, Goh, Aziz, & Loh, 2011).

##### **1.4.7.1.1 Cultivo en dos etapas**

El cultivo de microalgas en dos etapas consiste en la manipulación de las condiciones de cultivo y las concentraciones de los nutrientes para aumentar la tasa de reproducción de la célula y el contenido de lípidos en las microalgas. La primera etapa se centra en el desarrollo del número de células durante el

asentamiento de zoosporas y la segunda etapa es un aumento en el contenido de lípidos. Durante la segunda etapa, se presta más atención a la forma de enriquecer cada célula con lípidos en lugar de aumentar el número de células (Farooq, y otros, 2013).

Las concentraciones de nitrógeno son importantes en la primera etapa ya que ayuda a la reproducción de las células de microalgas, sin embargo las concentraciones de nitrógeno deben ser disminuidas en la segunda etapa a niveles que solo soportan la síntesis de enzimas y la formación de células. Por lo tanto, en la segunda etapa, cualquier fuente de carbono presente se convierte en lípidos en lugar de proteínas, mientras que la proteína es importante para el crecimiento de algas en la primera etapa (Markou & Nerantzis, 2013).

#### **1.4.7.2 Efecto del suministro de nitrógeno**

El efecto de la disminución de las fuentes de nitrógeno en los cultivos de microalgas, está asociado a la disminución de clorofila y los cloroplastos en la célula. El nitrógeno en los cultivo de microalgas ayudan a la formación de nuevas células, es decir en los procesos de división celular, por lo los bajos niveles de nitrógeno inhibe el crecimiento, lo cual nos indica que este nutriente es importante para optimizar las cantidades de biomasa y la productividad de los lípidos (Markou & Nerantzis, 2013).

La escasez de nitrógeno en el medio de cultivo reduce el contenido de proteína e hidratos de carbono las microalgas, por lo tanto el cultivo en condiciones de estrés de nitrógeno, sólo es apropiado si el producto final es el biodiesel. Es complicado analizar el período de agotamiento y la cantidad de la fuente de N que se deben aplicar durante el período de estrés, el periodo crítico para quitar la fuente de nitrógeno es la etapa de agotamiento de los

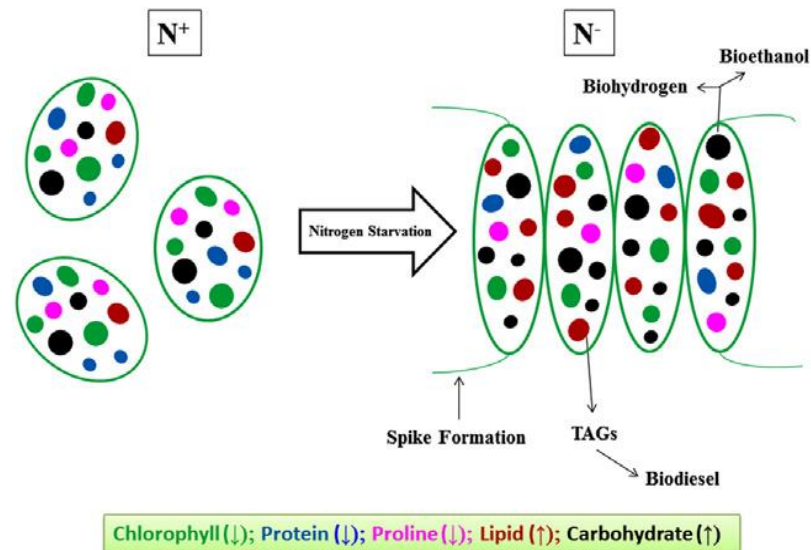


nutrientes, lo cual provoca el aumento en la producción de lípidos sin disminuir el crecimiento de las microalgas (Panchaa, y otros, 2014).

#### **1.4.7.3 Cambios bioquímicos de las microalgas en la deficiencia de nitrógeno**

Las limitaciones de nitrógeno para la inducción en el aumento del contenido lipídico, es considerado en varias investigaciones como el método más eficaz. Las microalgas alteran su biosíntesis para la acumulación de lípidos en condiciones de estrés, ya que utilizan el carbono para producir lípidos y no para formar nuevas células. Los lípidos se producen normalmente como un mecanismo de almacenamiento de energía durante condiciones desfavorables, además los lípidos como son los PL y GL, forman parte de compuestos estructurales de las células y forman parte de la membrana externa, de la membrana de cloroplasto y del retículo endoplásmico. Los TAGs son los componentes de almacenamiento primario que actúan como reservas de energía y los más abundantes en el metabolismo de las microalgas (Sharma, Pal, & Sharma, 2011).

El estrés de nitrógeno en las microalgas, estimula un cambio en el flujo de carbono en diferentes formas de canalizar la energía metabólica como en carbohidratos y lípidos; provocando una competencia entre la síntesis de dichos compuestos. Los lípidos e hidratos de carbono son los productos de almacenamiento predilectos en diversas condiciones de estrés, porque son de naturaleza hidrófoba, se almacenan de manera eficiente en pequeños compartimientos de las células y también pueden ser utilizados en condiciones adversas para la supervivencia celular y la proliferación (Panchaa, y otros, 2014).



**Figura 1.3** Cambios bioquímicos en las microalgas debido a las limitaciones de nitrógeno.

Fuente: (Panchaa, y otros, 2014)

Según Panchaa, y otros (2014), cuando se disminuyen las concentraciones de nitrógeno en el medio de crecimiento, aumenta significativamente el contenido de lípidos e hidratos de carbono en *Scenedesmus* sp. Además disminuye las concentraciones de proteína, prolina y clorofila en las células de las microalgas como se muestra en la figura 1.3.

### 1.5 Hipótesis

La disminución de las concentraciones de nitrógeno, tienen efecto sobre la cantidad de lípidos en la biomasa seca de la microalga *Chlorella* sp. aislada del reservorio de agua Cumbaya de la EEQ.

## **CAPÍTULO 2 : METODOLOGÍA**

### **2.1 Participantes**

El presente proyecto denominado “Evaluación de la disminución de nitrógeno para un cultivo de *Chlorella* sp. nativa y su efecto sobre el contenido lipídico, en el Laboratorio de Biotecnología Energética - Empresa Eléctrica Quito - Ecuador.”, fue financiado por la Corporación para la Investigación Energética (CIE).

El director del presente proyecto fue el Dr. Petronio Gavilanes, como co-director el Ing. Marco Taipe, docentes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE)

### **2.2 Zona de estudio**

El trabajo de investigación experimental se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Energética (BIOTEC), ubicado en el sector de Cumbaya en las instalaciones del Complejo Deportivo de la Empresa Eléctrica Quito (EEQ).

### **2.3 Periodo de investigación**

La tesis se desarrolló a partir del día 1 de diciembre del año 2013 en el Laboratorio de Biotecnología Energética, y tuvo una duración de 17 meses.

## **2.4 Diseño Experimental**

Para la evaluación de la disminución de nitrógeno en un cultivo de *Chlorella* sp. nativa y su efecto sobre el contenido lipídico, se planteó el siguiente diseño experimental.

### **2.4.1 Aislamiento e Identificación de *Chlorella* sp.**

Los resultados que se obtuvieron en este ensayo son de tipo cualitativo, ya que la identificación se realizó bajo el microscopio, siguiendo claves taxonómicas para la cepa de *Chlorella* sp.

### **2.4.2 ETAPA 1: Desarrollo de la biomasa de *Chlorella* sp.**

#### **2.4.2.1 Evaluación de los medios de cultivo**

Para evaluar el medio de cultivo más idóneo se determinó la densidad celular, la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación. Para lo cual se realizó un diseño completamente al azar (DCA), donde se trabajó con tres tratamientos que fueron los medios de cultivo BG-11, BBM y Chu#10, con tres repeticiones cada uno.

Las 9 unidades experimentales fueron colocadas al azar, para homogenizar los efectos ambientales y se les sometió a las mismas condiciones como: temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7.5, fotoperiodo de 12: 12 horas luz/oscuridad con una intensidad lumínica de  $12.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y agitación manual (ver tablas 2.1).

**Tabla 2.1** Aleatorización de las unidades experimentales de la etapa.

<b>Aleatorización de las unidades experimentales</b>				
2A	2C	3C	3B	
3A	2B	1A	1C	1B

Los resultados de esta investigación fueron analizados mediante el programa estadístico InfoStat.

### 2.4.3 ETAPA 2: Estrés de nitrógeno

Para determinar la concentración limitante de nitrógeno que favorece la acumulación de lípidos, se realizó un DCA con 5 tratamientos y 3 repeticiones cada uno (ver tabla 2.2). Las 15 unidades experimentales se colocaron al azar, y manteniendo las mismas condiciones de cultivo.

**Tabla 2.2** Descripción de los tratamientos de la fase 2.

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
<b>T5=100%</b>	Medio Chu#10 con 40 g L <sup>-1</sup> Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>T4=75%</b>	Medio Chu#10 con 30 g L <sup>-1</sup> Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>T3=50%</b>	Medio Chu#10 con 20 g L <sup>-1</sup> Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

<b>T2=25%</b>	Medio Chu#10 con 10 g L <sup>-1</sup> Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>T1=0%</b>	Medio Chu#10 sin Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

---

De igual manera se analizarán los datos de este ensayo en el programa estadístico InfoStat.

## **2.5 Procedimientos**

### **2.5.1 Colecta de muestra**

Se estableció el punto de muestreo en el reservorio de agua de la Empresa Eléctrica Quito – Cumbaya (figura 2.1). El efluente se colectó en una botella plástica con capacidad de 6 L. La muestra se trasladó inmediatamente al Laboratorio de Biotecnología Energética (BIOTEC), donde se procedió al aislamiento del material. Además se observó al microscopio la biodiversidad de microalgas en la muestra.



**Figura 2.1** Sitio de colecta del efluente para el aislamiento.

### **2.5.2 Aislamiento e identificación de *Chlorella* sp.**

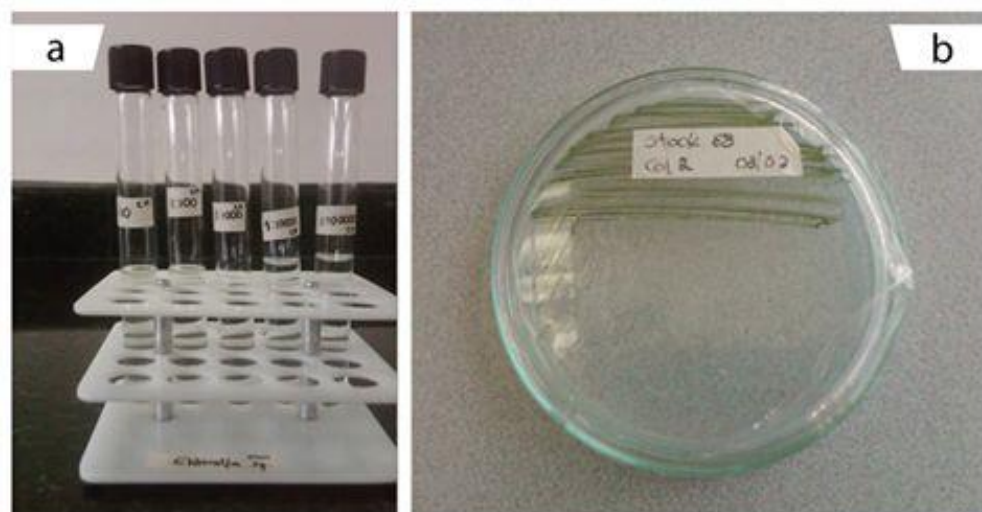
La identificación de la microalga se realizó mediante la observación microscópica de las muestras y basándose en claves taxonómicas según Wehr J. & Sheath R. (2003), Bellinger E. & Sigeo D. (2010) y Barreno E, & Pérez S. (2003).

Para el aislamiento de la cepa de *Chlorella* sp. se llevó a cabo por la combinación de dos técnicas; diluciones seriadas y aislamiento en placas con medio sólido nitrofoska (fertilizante foliar) al 3% (TECNOPLADES, 2014).

El método de diluciones consiste en colocar 5 tubos de ensayo de 10 mL de capacidad en una gradilla. En el primer tubo (1:10) se colocó, 1 mL del inóculo y 9 mL de agua destilada; el segundo tubo (1:100) se colocó 1 mL del primer tubo y 9 mL de agua destilada; en el tercer tubo se colocó 1 mL del

segundo tubo y 9 mL de agua destilada de esta forma hasta llegar a la dilución 1: 100000. Los tubos se mantuvieron bajo condiciones estériles, temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , pH 7.5, fotoperiodo de 12 horas luz: y 12 horas oscuridad con una intensidad lumínica de  $12.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , hasta observar crecimiento bajo el microscopio.

Para realizar el método en placas con medio sólido nitrofoska al 3%, se colocó el inóculo de los tubos de las diluciones, con ayuda de una asa bacteriológica al medio sólido en forma estriada (ver figura 2.2). Las placas se mantuvieron a las mismas condiciones de cultivo antes mencionadas.



**Figura 2.2** Métodos de aislamiento de *Chlorella* sp. a) método de diluciones seriadas, b) método en cajas en medio sólido.

Las colonias aisladas se pasaron a un tubo de ensayo con 9 mL de medio líquido nitrofoska al 3%, bajo las condiciones de cultivo antes indicadas. El cultivo se monitoreo periódicamente bajo el microscopio para asegurarnos de que no exista contaminación. Cada 7 días se adicionó el doble de su volumen



con medio de cultivo nitrofoska, hasta obtener 500 mL del cultivo monoespecífico de *Chlorella* sp. nativa.

### **2.5.3 ETAPA 1: Desarrollo de la biomasa de *Chlorella* sp.**

La primera etapa radica principalmente en la masificación del cultivo de *Chlorella* sp. aislada de reservorio de agua de la EEQ, empleando condiciones de cultivo óptimas para el crecimiento de la microalga, para lo cual se realizó los siguientes ensayos.

#### **2.5.3.1 Evaluación de los medios de cultivo en el crecimiento de *Chlorella* sp.**

Los medios de cultivo que se evaluaron fueron BG-11, Bold Basal y Chu #10, los cuales se prepararon según Andersen (2005) (Ver anexo A).

##### **2.5.3.1.1 Determinación del valor de inóculos para los ensayos**

Para determinar el inóculo inicial de cada ensayo se realizó un conteo celular del cultivo monoespecífico de *Chlorella* sp. bajo el microscopio. Con la ayuda de la cámara de Neubauer se obtuvo un promedio celular  $N$  y se aplicó en la siguiente fórmula (Morales, 2013).

$$DC_{inoculo} = N \times 10^4 \times (Fd)$$

$DC_{inoculo}$  = Densidad celular del inóculo (cel mL<sup>-1</sup>.)

Donde:

$N$ = Promedio de células presentes en 1 mm<sup>2</sup> (0.1 µL) - número de cuadrantes contados en la cámara de Neubauer.

$10^4$ = Factor de conversión de 0.1 µL a 1 mL.

$F_d$ = Factor de dilución (cuando sea necesario)

Posteriormente con el fin de conocer el volumen necesario de inóculo, se aplicó la siguiente fórmula:

$$V_2 = \frac{V_1 \times DC_{inicial}}{DC_{inoculo}}$$

Donde:

$V_2$ = Volumen de inóculo necesario para el ensayo

$DC_{inicial}$ =  $1 \times 10^6$

$V_1$ = Volumen total del ensayo

$DC_{inoculo}$ = Densidad celular obtenida del conteo en la cámara Neubauer.

### 2.5.3.1.2 Evaluación de los medios de cultivo

Para evaluar los medios de cultivo se determinó las curvas de crecimiento de cada uno de los ensayos con diferentes medios de cultivo. Para lo cual se colocó el inóculo de *Chlorella* sp. previamente calculado, en un volumen final de 200 mL de cada medio, los ensayos se realizaron por triplicado. Los cultivos iniciaron con una densidad celular de  $1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>. Se

determinó la cinética de crecimiento mediante conteos cada dos días de la densidad celular utilizando la cámara de Neubauer. Estos experimentos se mantuvieron bajo las siguientes condiciones de cultivo: temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , pH 7.5, fotoperiodo de 12: 12 horas con una intensidad lumínica de  $32.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y agitación manual.



**Figura 2.3** Cultivo de *Chlorella* sp. para evaluar la cinética de crecimiento en medio Chu #10, Bold Basal y BG11.

### 2.5.3.1.3 Parámetros de crecimiento

Para determinar la velocidad de crecimiento  $\mu$  y la tasa de duplicación  $T_d$  se aplicarán las siguientes fórmulas (Lobban, Chapman, & Kremer, 1998).

$$\mu = \frac{\ln x_1 - \ln x_0}{t_1 - t_0}$$

Donde:

$t_1, t_0$ = Tiempo final e inicial.

$x_1, x_2$ = Densidad celular final e inicial en fase logarítmica

El tiempo de duplicación ( $T_d$ ) será determinado mediante la siguiente ecuación (Lobban, Chapman, & Kremer, 1998).

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Donde:

$T_d$ = tiempo de duplicación

$\mu$ = velocidad de crecimiento

### **2.5.3.2 Escalamiento del cultivo de *Chlorella* sp.**

Para el escalamiento del cultivo de *Chlorella* sp. se evaluó las curvas de crecimiento y los parámetros cinéticos del cultivo. El ensayo con el medio de cultivo que presento mayor densidad celular, mayor velocidad de crecimiento y menor tiempo de duplicación, se escaló a un volumen de 120 L.

El escalamiento inició con 3 frascos de 200 mL cada uno, a los cuales se les adicionó cada 7 días el doble del medio de cultivo seleccionado. Estos cultivos se mantuvieron bajo condiciones óptimas para su crecimiento como: agitación constante proveniente de bombas de aireación, temperatura de 23

$\pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH de 7.5 y una intensidad lumínica de  $32.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proveniente de lámparas fluorescentes (figura 2.4).



**Figura 2.4** Escalamiento del cultivo de *Chlorella* sp. a 200 mL en medio Chu #10.

Posteriormente en una botella de plástico estéril de 1L, se colocó el cultivo anterior y se añadió 200 mL del medio seleccionado (ver figura 2.5). El cultivo se mantuvo bajo condiciones controladas con agitación constante proveniente del burbujeo de una bomba de aire, temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH de 7.5 y una intensidad lumínica de  $32.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , con un fotoperiodo de 12:12 luz / oscuridad. Estos cultivos se operaron bajo condiciones estériles para evitar contaminación con otro tipo de microalgas o de otros microorganismos.

A las botellas se marcó una línea al nivel del medio de cultivo, para comprobar que no exista evaporación de medio; si este fuera el caso se

adiciona agua destilada para cubrir el déficit de agua y evitar la concentración de reactivos en el medio.



**Figura 2.5** Escalamiento del cultivo de *Chlorella* sp. a 500 mL en medio Chu #10.

Siguiendo el mismo patrón el cultivo de *Chlorella* sp. se escaló hasta alcanzar un volumen de 120 L, los cuales se colocaron en 8 fotobioreactores contruidos con plástico con una capacidad de 15 L cada uno como se muestra en la figura 2.6. Las condiciones de cultivo fueron, agitación constante proveniente del burbujeo de una bomba de aire, temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , pH de 7.5 y una intensidad lumínica de  $65.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , con un fotoperiodo de 12:12 horas.



**Figura 2.6** Escalamiento del cultivo de *Chlorella* sp. a fotobioreactores de 15 L c/u.

### 2.5.3.3 Cosecha y lavado de la biomasa

Una vez que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria, se colocó  $1 \text{ gL}^{-1}$  del floculante sulfato de aluminio, se dejó reposar hasta que se observa claramente dos fases, la sólida que corresponde a las microalgas y la fase líquida que es el medio de cultivo. Para separar las dos fases se utilizó un tamiz, donde las células que quedaron atrapadas se lavaron con abundante agua destilada para remover cualquier resto de nutrientes principalmente el nitrógeno (ver figura 2.7). La biomasa húmeda que se obtuvo se utilizó para realizar la etapa de estrés de nitrógeno y para el análisis del perfil lipídico que se envió al laboratorio OSP de la Universidad Central del Ecuador.



**Figura 2.7** Separación de medio líquido y sólidos (biomasa de *Chlorella* sp.) mediante un tamiz.

#### 2.5.3.4 Productividad de la biomasa

La productividad de la biomasa está expresada como la relación entre la variación de la biomasa seca obtenida en el transcurso del cultivo y el producto entre el tiempo y el volumen utilizado en el cultivo.

Este aspecto es trascendental en un cultivo de microalgas, ya que al aumentar la productividad de estos microorganismos, se puede incrementar la rentabilidad del proceso productivo (Serrano, 2012).

$$P_{bio} = \frac{\text{Peso seco final} - \text{peso seco inicial}}{(\text{tiempo de cultivo}) * (\text{volumen de cultivo})}$$



### 2.5.4 ETAPA 2: Estrés de nitrógeno en *Chlorella* sp.

Se realizó 5 tratamientos disminuyendo la concentración de nitrógeno del medio de cultivo seleccionado. En fotobioreactores de plástico se colocó el inóculo previamente lavado y la biomasa húmeda correspondiente a 2 L de medio de cultivo. Estos ensayos se realizaron por triplicado, y en condiciones de cultivo antes mencionadas.

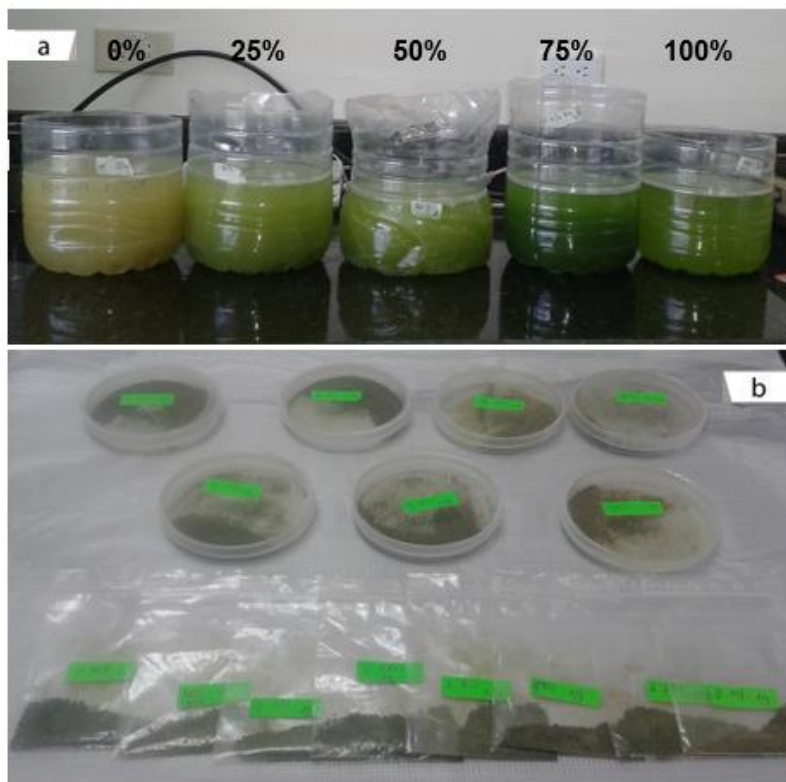


**Figura 2.8** Etapa 2, estrés nutricional de nitrógeno, fotobioreactores de 2 L de capacidad, colocados al azar.

#### 2.5.4.1 Cosecha y secado de la biomasa

Transcurridos 15 días de estrés de nitrógeno, los cultivos se cosecharon utilizando  $1 \text{ g L}^{-1}$  de sulfato de aluminio y con ayuda de un tamiz se procedió a separar las microalgas del medio. Esta biomasa se colocó en cajas Petri y se secó al ambiente durante 2 días. A continuación se realizó una disrupción

mecánica a la biomasa seca con ayuda de mortero y pistilo, con la finalidad de romper las paredes celulares para el posterior análisis lipídico en los laboratorios OSP de la Universidad Central del Ecuador (ver figura 2.9).



**Figura 2.9** Cosecha de la biomasa a) floculación con sulfato de aluminio  $1\text{g L}^{-1}$ , de los ensayos con disminución de nitrógeno en el medio, b) secado de la biomasa para el posterior análisis.

### 2.5.5 Perfil Lipídico

La biomasa seca de la etapa 1 y la biomasa del tratamiento que presento el mejor porcentaje de lípidos en la etapa 2, se enviaron al laboratorio OSP de la Universidad Central Del Ecuador, para el análisis de perfil lipídico. En dicho

laboratorio utilizaron como método una cromatografía de gases para determinar el contenido de ácidos grasos, los cuales se muestran tabla 2.3.

**Tabla 2.3** Ácidos grasos presentes en el perfil lipídico.

<b>Ácidos Grasos</b>	<b>Fórmula</b>
<b>TOTAL ÁCIDOS GRASOS SATURADOS</b>	
<b>TOTAL ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS</b>	
<b>Ácidos grasos Poliinsaturados</b>	
<b>Ácidos grasos Monoinsaturados</b>	
<b>Ácido Palmítico</b>	C16:0
<b>Ácido Palmitoleico</b>	C16:1
<b>Ácido Óleico</b>	C18:1n9 cis ω9
<b>Ácido Linoléico</b>	C18:2n6 cis ω6
<b>Ácido cis- 11,14</b>	
<b>Eicosadienoico</b>	C20:2

## 2.6 Análisis de datos

Se realizó un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA) de clasificación, con tres repeticiones cada uno en la etapa 1 y 2. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con una confianza del 95%, para establecer las diferencias entre cada tratamiento se realizó una prueba de Tukey con una significancia del 5%. Además se realizó un análisis de frecuencia para poder determinar gráficamente la diferencia entre tratamientos.

## CAPÍTULO 3 : RESULTADOS

Los resultados de la presente investigación se dividieron en: Aislamiento e identificación, primera etapa (desarrollo del número de células), segunda etapa (estrés de nitrógeno) y perfil lipídico los cuales se presentan a continuación.

### 3.1 Aislamiento e identificación de *Chlorella* sp.

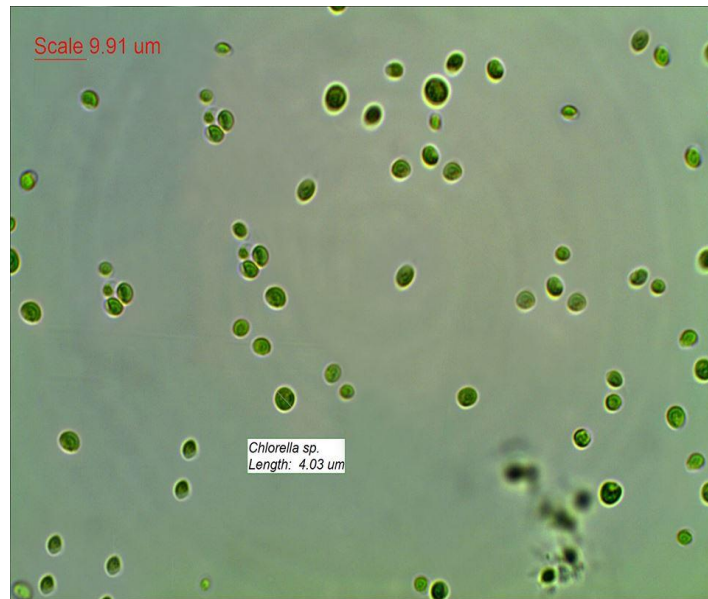
Las microalgas fueron identificadas siguiendo las claves taxonómicas según Wehr J. & Sheath R. (2003), Bellinger E. & Sigeo D. (2010), Barreno E, & Pérez S. (2003), y presentaron las características descritas en la tabla 3.1.

**Tabla 3.1** Características en la identificación de *Chlorella* sp. según claves taxonómicas.

	Características
<b>Forma</b>	esférica
<b>Tamaño</b>	<10 µm de diámetro
<b>Color</b>	verde, un solo cloroplasto parietal
<b>Pirenoide</b>	único
<b>Hábitat</b>	agua dulce

El aislamiento se llevó a cabo en placas de agar sólido, donde las colonias de *Chlorella* sp. aparecieron a los 10 días de la siembra, presentando una

forma esférica bien definida, color verde intenso y de apariencia lisa (Ver figura 3.1).



**Figura 3.1** Vista al microscopio (100x) de *Chlorella* sp. aislada, de 4.03 μm de diámetro.

Posterior al aislamiento las colonias fueron trasladadas a un tubo de ensayo con medio líquido de nitrofoska al 3%, para la obtención del inóculo que se utilizó en los ensayos posteriores.

### **3.2 ETAPA 1: Desarrollo de la biomasa de *Chlorella* sp.**

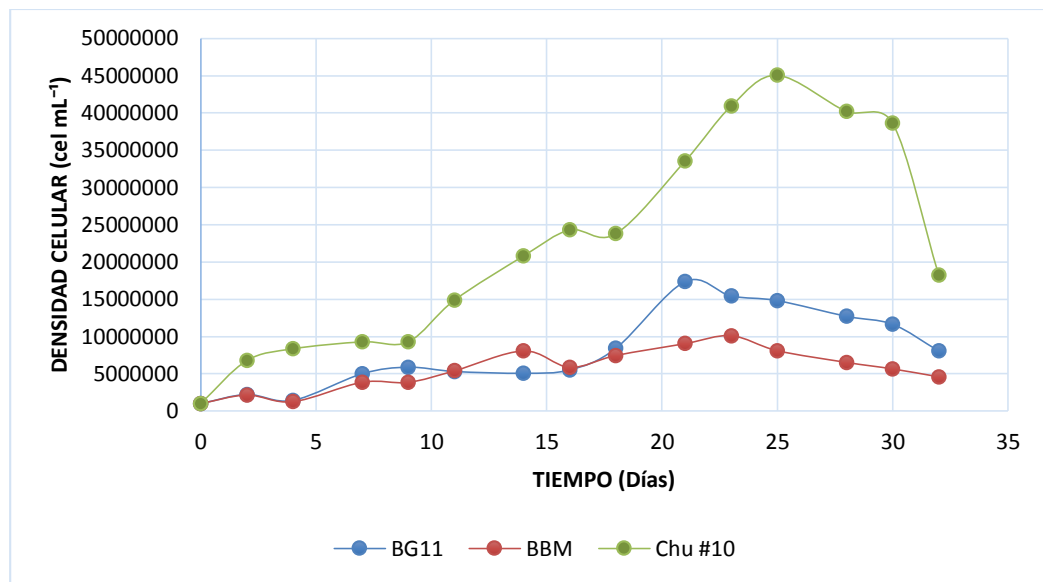
La primera etapa consiste en el desarrollo del cultivo de *Chlorella* sp., para lo cual se determinó el medio de cultivo óptimo en el crecimiento de la microalga y se obtuvo los siguientes resultados.

### 3.2.1 Evaluación de los medios de cultivo en el crecimiento de *Chlorella* sp.

Se evaluó los medio de cultivo en el crecimiento de *Chlorella* sp., para lo cual elaboró las curvas de crecimiento en los medios de cultivo Chu#10, BBM y BG-11 (ver figura 3.3). Donde se observan las fases de adaptación, de crecimiento y de muerte para cada una de ellas. Estos aspectos se toman en cuenta al momento de la cosecha para aprovechar los días que existe mayor presencia de biomasa microalgal.

En la curva de crecimiento con medio Chu#10, se observa que el periodo de adaptación se extiende durante 9 días, y a partir del día 11 empieza la fase exponencial de crecimiento, donde alcanza el valor máximo de células de  $4.51 \times 10^7$  al día 25. La fase de muerte empieza el día 28 y se extiende hasta el 32 donde finalizó el conteo.

El medio BBM presenta un periodo de adaptación más largo y no es tan notable la fase exponencial, alcanza un máximo de células de  $1.01 \times 10^7$  al día 23. El cultivo en medio BG-11 alcanza un máximo de células de  $1.74 \times 10^7$  en el día 21, la fase de muerte inicia en el día 23 hasta el 32.



**Figura 3.2** Curva de crecimiento de la cepa *Chlorella* sp. en los medios en diferentes medios de cultivo.

Se analizó la densidad celular ( $\text{cel mL}^{-1}$ ) en los diferentes medios de cultivo (BG-11, BBM y Chu#10), mediante un ANOVA para cada uno de los días que se realizó el conteo celular, se determinó que presenta una variabilidad estadísticamente significativa con excepción del día 9 y 18 (ver tabla 3.2).

**Tabla 3.2** Resumen del análisis de varianza de la densidad celular con diferentes medios de cultivo.

		Días					
		2		4		7	
FV	GL	CM	P-valor	CM	P-valor	CM	P-valor
Medio	2	1263175.2	0.0001	3001230.4	0.0001	940001.5	0.0025
Error	6	15746.1		5297.9		49039.4	
TOTAL	8						
		9		11		14	
FV	GL	CM	P-valor	CM	P-valor	CM	P-valor
Medio	2	816280.8	0.0445	2343346.5	0.0016	4333726.2	0.001
Error	6	149413.6		102957.5		57796.7	
TOTAL	8						
		16		18		21	
FV	GL	CM	P-valor	CM	P-valor	CM	P-valor
Medio	2	6510553.2	0.0002	4001776.3	0.155	5875348.9	0.0001
Error	6	143140.8		443029.8		94421.4	
TOTAL	8						
		23		25		28	
FV	GL	CM	P-valor	CM	P-valor	CM	P-valor
Medio	2	8582639.7	0.0011	12193331.2	0.0003	11617784.8	0.0001
Error	6	330053.6		293827.4		100056.04	
TOTAL	8						
		30		32			
FV	GL	CM	P-valor	CM	P-valor		
Medio	2	11855115.1	0.0001	3585274.05	0.0008		
Error	6	43158.09		124257.7			
TOTAL	8						



El medio Chu#10 según la tabla 3.3 se ubica en el subconjunto A, ya que presenta la mejor media en todos los días que se realizó el conteo, inclusive en los que no se presentó significancia.

**Tabla 3.3** Diferencia de medias que determina el medio de cultivo que favorece el crecimiento de *Chlorella* sp.

MEDIO DE CULTIVO	Día 2		Día 4		Día 7		Día 9	
	MEDIA	SUB CONJUNTO	MEDIA	SUB CONJUNTO	MEDIA	SUB CONJUNTO	MEDIA	SUB CONJUNTO
<b>Chu#10</b>	2597.4	A	2888.6	A	3036	A	3003.2	A
<b>BG-11</b>	1489.9	B	1195.4	B	2232.2	B	2424	A B
<b>BBM</b>	1457.8	B	1119.5	B	1959.3	B	1962.1	B
	Día 11		Día 14		Día 16		Día 18	
<b>Chu#10</b>	3837.2	A	4556.1	A	4916.2	A	4801	A
<b>BG-11</b>	2319.7	B	2834.4	B	2411.6	B	2879.9	A
<b>BBM</b>	2293.3	B	2242.5	B	2320.1	B	2729.6	B
	Día 21		Día 23		Día 25		Día 28	
<b>Chu#10</b>	5790.3	A	6382.5	A	6701.4	A	6342.8	A
<b>BG-11</b>	4145.7	B	3889.5	B	3815.	B	3547.7	B
<b>BBM</b>	3006.7	C	3155.8	B	2819.9	B	2545.5	C
	Día 30		Día 32					
<b>Chu#10</b>	6214.6	A	4273.03	A				
<b>BG-11</b>	3405.3	B	2802.6	B				
<b>BBM</b>	2373.5	C	2136.5	B				

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### 3.2.2 Parámetros cinéticos del crecimiento de la microalga *Chlorella* sp.

#### 3.2.2.1 Velocidad de crecimiento

La velocidad de crecimiento es un parámetro importante que influyen en la determinación del medio de cultivo apropiado para desarrollo de *Chlorella* sp. nativa. Para lo cual se realizó un ANOVA donde presento una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (ver tabla 3.4).

**Tabla 3.4** Análisis de varianza para la variable velocidad de crecimiento.

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Modelo.</b>	0.02	2	0.01	28.52	0.0009
<b>Medio Cultivo</b>	0.02	2	0.01	28.52	0.0009
<b>Error</b>	0.0026	6	0.00044		
<b>Total</b>	0.03	8			

El medio Chu#10 se posicionó en el subconjunto A con la media más alta como indica la tabla 3.5. El medio BG-11 y BBM en el B y C respectivamente.

**Tabla 3.5** Análisis de medias de la variable velocidad de crecimiento.

<b>Medio Cultivo</b>	<b>Medias</b>	<b>Subconjuntos</b>
Chu#10	0.75	A
BG-11	0.68	B
BBM	0.62	C

### 3.2.2.2 Tiempo de duplicación (Td)

El Td (menor tiempo de duplicación, mayor densidad celular) según la tabla 3.6 se puede observar que existe una diferencia significativa entre los tratamientos.

**Tabla 3.6** Análisis de varianza para la variable tiempo de duplicación (días).

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Modelo.</b>	0.06	2	0.03	22.13	0.0017
<b>Medio</b>	0.06	2	0.03	22.13	0.0017
<b>Error</b>	0.01	6	0.0013		
<b>Total</b>	0.06	8			

El medio Chu #10 presenta la media más baja en comparación a los medios BG-11 y BBM, por lo tanto se ubica en el subconjunto A.

**Tabla 3.7** Análisis de medias de la variable tiempo de duplicación.

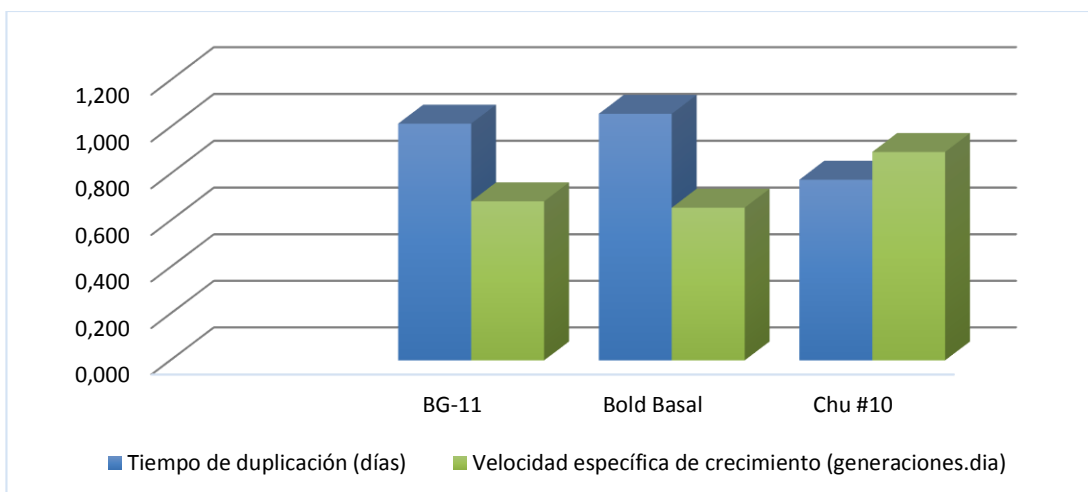
<b>Medio Cultivo</b>	<b>Medias Subconjuntos</b>	
Chu#10	0.93	A
BG-11	1.02	B
BBM	1.12	C

En la tabla 3.8 se muestra en resumen los promedios de los parámetros cinéticos, donde se puede observar claramente que el medio Chu #10 favoreció la velocidad de crecimiento (0.894 días), presentó un menor tiempo de duplicación (0.775 días) y alcanzó la mayor cantidad de células ( $4.51 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>).

**Tabla 3.8** Resumen de los parámetros cinéticos en diferentes medios de cultivo.

Medio de Cultivo	Tiempo de duplicación (días)	Velocidad específica de crecimiento (divisiones por día)	Valor máximo de células mL <sup>-1</sup>
<b>Chu #10</b>	0.775	0.894	$4.51 \times 10^7$
<b>BG-11</b>	1.015	0.683	$1.74 \times 10^7$
<b>BBM</b>	1.057	0.656	$1.01 \times 10^7$

Se elaboró un análisis de frecuencia para comparar los medios de cultivo (BG-11, BBM y Chu#10) con respecto a los parámetros de cultivo, tiempo de duplicación y velocidad de crecimiento. Como se observa en la figura 3.3 el medio Chu#10 presenta la mayor velocidad de crecimiento y menor tiempo de duplicación.



**Figura 3.3** Parámetros de crecimiento de los medios de cultivo BG-11, BBM y Chu#10.

### 3.2.3 Productividad de la biomasa

La productividad de la biomasa ( $P_{bio}$ ) en la etapa 1 del cultivo de *Chlorella* sp. aislada del reservorio de agua de la EEQ- Cumbaya, se muestra en la tabla 3.9. El promedio de la  $P_{bio}$ , fue de  $63.81 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ , bajo las siguientes condiciones de cultivo: medio Chu#10, con una temperatura ambiental de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , pH 7.5, fotoperiodo de 12: 12 horas con una intensidad lumínica de  $32.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y agitación manual.

**Tabla 3.9** Productividad de la biomasa de cada uno de los bioreactores.

<b>Fotobioreactor</b>	<b>Pbio (mg L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>)</b>
1	70.55
2	54.90
3	64.40
4	52.04
5	74.94
6	67.10
7	43.14
8	83.50
<b>Promedio</b>	<b>63.81</b>

### 3.3 ETAPA 2: Estrés nutricional de nitrógeno en *Chlorella* sp.

La segunda etapa consiste en inducir estrés por déficit de nitrógeno a la microalga *Chlorella* sp. para la acumulación de lípidos, donde se obtuvo los siguientes resultados.

#### 3.3.1 Contenido lipídico de los tratamientos sometidos a limitaciones de nitrógeno.

El contenido lipídico de los tratamientos sometidos a estrés de nitrógeno en medio Chu #10 de *Chlorella* sp. se muestran en la tabla 3.10. El valor más

alto de los tratamientos fue de 2.15% que corresponde a T1, el menor valor fue de T5 con 1.04%.

**Tabla 3.10** Contenido lipídico de *Chlorella* sp. obtenidas en las diferentes concentraciones de nitrógeno limitantes.

	TRATAMIENTOS [ ] de Nitrógeno				
	T5 100%	T4 75%	T3 50%	T2 25%	T1 0%
I	0.87	1.27	0.82	1.44	1.72
II	0.86	1.14	1.27	1.47	2.44
III	1.39	0.82	1.37	1.39	2.28
<b>Promedio</b>	1.04	1.08	1.15	1.43	2.15

Los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5, sometidos a limitaciones de nitrógeno según la tabla 3.11, presentan entre si una diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla 3.11** Análisis de varianza de los tratamientos sometidos al estrés de nitrógeno.

F.V.	SC	gL	CM	F	p-valor
<b>Modelo.</b>	2.55	4	0.64	8.47	0.003
<b>Limitación de N</b>	2.55	4	0.64	8.47	0.003
<b>Error</b>	0.75	10	0.08		
<b>Total</b>	3.3	14			

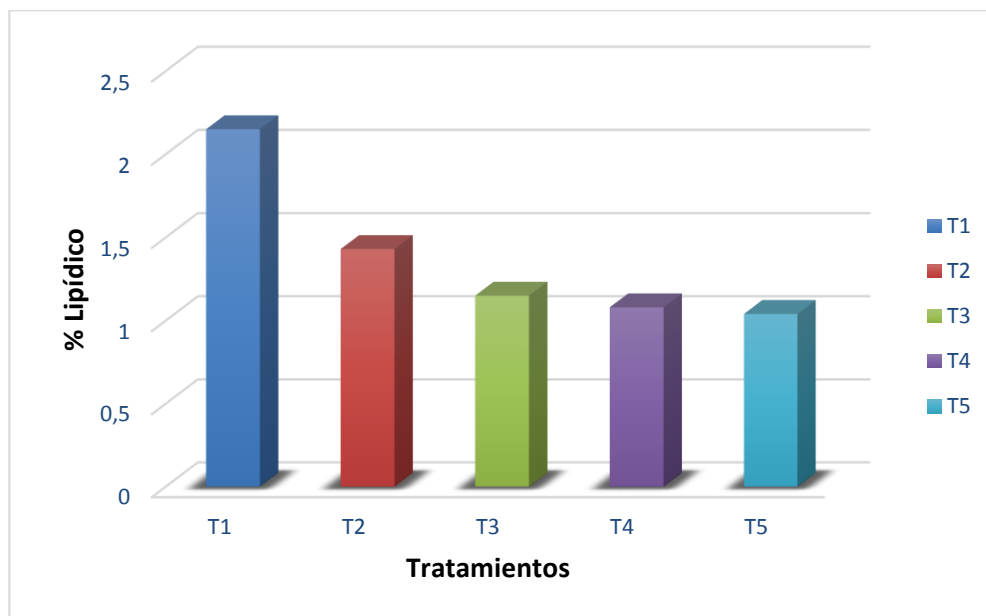
El T1 y T2 pertenecen al subconjunto A, además T2 también se encuentra en el subconjunto B con T3, T4 y T5 (ver tabla 3.12).

**Tabla 3.12** Análisis de medias que determina el tratamiento que favorece la acumulación de lípidos en *Chlorella* sp.

Limitación de N	Medias	Subconjuntos
T1	2.15	A
T2	1.43	A B
T3	1.15	B
T4	1.08	B
T5	1.04	B



Adicionalmente se elaboró una columna de distribución de frecuencias basándose en los datos de la tabla 3.10, para analizar el porcentaje lipídico de los tratamientos sometidos a estrés de nitrógeno. En la figura 3.4 indica que el mejor tratamiento es el T1; entre T3, T4, y T5 no existe mucha diferencia.



**Figura 3.4** Porcentaje lipídico de cada tratamiento sometidos a estrés de nitrógeno.

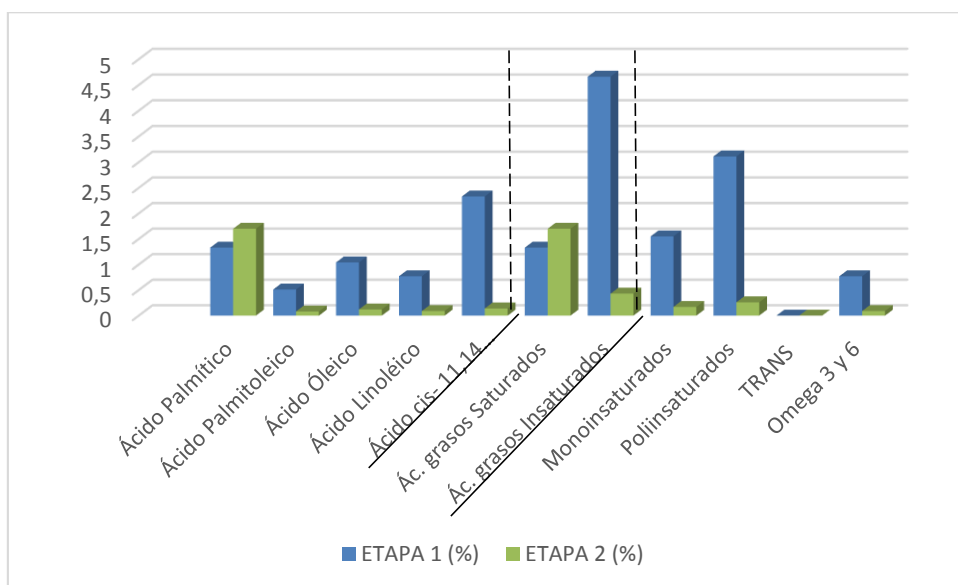
### 3.4 Perfil Lipídico: ETAPA 1 y 2

La composición de los ácidos grasos de *Chlorella* sp. en la etapa 1 y 2, se detallan en la tabla 3.8. En la primera etapa, el cual se desarrolló en medio Chu#10, se obtuvo 5.99% de lípidos totales en las células. En la segunda etapa, que corresponde a la fase donde se sometió a estrés a la microalga, previamente resultó que T1 presentó mayor porcentaje lipídico. A dicho tratamiento se analizó el perfil lipídico y se obtuvo 2.13% de lípidos totales.

**Tabla 3.13** Composición de ácidos grasos de la microalgas *Chlorella* sp. en las etapas 1 y 2.

Ácidos Grasos	Fórmula	ETAPA 1 (%)	ETAPA 2 (%)	<i>Chlorella vulgaris</i> (Serrano, 2012)	<i>Chlorella</i> (Alvear, Castillo, & Henao, 2011)	<i>Chlorella protothecoides</i> (Andrade Beltrán, 2013)
Ácido Palmítico	C16:0	1.33 (22%)	1.7 (79.8%)	17.2	4.82	4.49 (46.38%)
Ácido Palmitoleico	C16:1	0.51 (8.5%)	0.08 (3.75%)	0	0.51	0.24 (2.48%)
Ácido Óleico	C18:1n9 cis ω9	1.04 (17.4%)	0.12 (5.63%)	3.5	36.58	1.38 (14.26%)
Ácido Linoléico	C18:2n6 cis ω6	0.77 (12.8%)	0.09 (4.22%)	21.4	20.76	1.42 (14.67%)
Ácido cis- 11,14 Eiosadienoico	C20:2	2.33 (38.9%)	0.14 (6.57%)	-----	-----	
<b>Total ácidos grasos Saturados</b>		1.33 (22%)	1.7 (79.8%)	28.9	5.89	6.2 (64.05%)
<b>Total ácidos grasos Insaturados</b>		4.66 (77.8%)	0.43 (20.2%)	71.1	94.1	3.48 (35.95%)
<b>Total ácidos grasos Monoinsaturados</b>		1.55 (25.9%)	0.17 (7.98%)	12.1	-----	2.06 (21.28%)
<b>Total ácidos grasos Poliinsaturados</b>		3.11 (51.9%)	0.26 (12.2%)	59	-----	1.42 (14.67%)
<b>Total ácidos grasos TRANS</b>		0	0	-----	-----	0
<b>Total ácidos grasos Omega 3 y 6</b>		0.77 (12.8%)	0.09 (4.22%)	59	-----	0
<b>TOTAL ÁCIDOS GRASOS</b>		5.99	2.13			9.68

Se realizó un análisis de frecuencias basándose en los datos de la tabla 3.13, para comparar el perfil lipídico de *Chlorella* sp. en la etapa 1 y 2. Claramente observamos que en la etapa 1 existe mayor cantidad de ácidos grasos insaturados, y la etapa 2 presenta en mayor cantidad de ácidos grasos saturados.



**Figura 3.5** Porcentajes lipídicos de los ácidos grasos presentes en la microalga *Chlorella* sp. en la etapa 1 y 2.

## CAPÍTULO 4 : DISCUSIÓN

### 4.1 Aislamiento e identificación de *Chlorella* sp.

El género *Chlorella* es uno de los más estudiados, ya que durante algunos años han despertado gran interés ecológico, industrial y biotecnológico. La caracterización taxonómica a nivel de especie es muy compleja, ya que presentan entre ellas pequeñas diferencias morfológicas que solo a nivel molecular podrían diferenciarse (Moronta, Mora, & Morales, 2002). Consecuentemente la identificación que se realizó en la presente investigación fue mediante claves taxonómicas según Wehr J. & Sheath R. (2003), Bellinger E. & Sigee D. (2010) y Barreno E, & Pérez S. (2003), a nivel de género.

Al observar bajo el microscopio óptico las colonias que crecieron en el agar sólido nitrofoska, mostraron la presencia de todas las características que distinguen al género *Chlorella* como: la presencia de un solo pirenoide, forma esférica, el tamaño menor a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, y el de color verde intenso por la presencia de clorofila. Las mismas características observó Maldonado (2014), en la microalga *Chlorella emersonii* nativa Ecuatoriana, donde también identificó a nivel de género mediante claves taxonómicas.

Para el cultivo de microalgas es importante la elección de la especie de microalga que se va a cultivar y las futuras aplicaciones de los metabolitos. Es importante considerar como predilectas a las especies nativas, ya que estas presentan tolerancia a los factores ambientales propios de la zona, y se evita la introducción de especies invasoras o especies alóctonas (Bernardino , Scott, Mendoza, Espinal, & Zapata , 2008). En estos aspectos radica la

importancia del aislamiento de *Chlorella* sp. del reservorio de agua de la EEQ, ya que siendo una microalga nativa tiene mejor adaptabilidad a las condiciones climáticas como, temperatura, radiación, la humedad, pH del medio entre otras.

El aislamiento de una cepa nativa de microalga, es el punto de partida para determinar las posibles aplicaciones biotecnológicas de estos microorganismos. En el caso de *Chlorella* sp. nativa se determinó la bioprospección de los lípidos como potencial materia prima en diferentes procesos productivos (Ruíz, 2011).

#### **4.2 ETAPA 1: Medio de cultivo idóneo en el crecimiento de *Chlorella* sp.**

Se evaluó tres diferentes medios de cultivo en laboratorio para *Chlorella* sp. nativa, los cuales fueron: Bold Basal (BBM), Chu #10 y BG-11. La microalga creció en los tres medios, ya que estos contienen elementos como N, P, K, Mg, Ca, S, Fe, Mn y Si, que son necesarios para el crecimiento. La diferencia son las concentración de estos elementos inorgánicos de un medio a otro (Ilavarasi, Mubarakali, Praveenkuma, Baldey, & Thajuddin, 2011).

La cinética de crecimiento de *Chlorella* sp. en medio Chu #10, nos indica que hubo una mejor adaptabilidad de la microalga en este medio, en comparación a los otros dos medios de cultivo probados. De igual manera la fase de crecimiento fue mayor, es decir que en este medio se reprodujeron las células en mayor cantidad ( $4.51 \times 10^7$  cél mL<sup>-1</sup>). En los parámetros cinéticos también se destacó el medio chu#10, ya que obtuvo una mayor velocidad de crecimiento (0.894 días) y menor tiempo de duplicación (0.775 días), en comparación al medio BG-11 y BBM. Estos resultado son similares a los obtenidos por Sharma, Pal, & Sharma (2011), donde el medio Chu #10

promovió el crecimiento de *Chlorella vulgaris*, superando a el medio Juller's, BBM, N-8 y Kuhl's.

El crecimiento de las microalgas se ve influenciado por varios factores como luz, pH, aireación adecuada y muy importante la disponibilidad de nutrientes, los cuales tienen una función específica en la microalga. En el medio Chu #10 la fuente de nitrógeno es la  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , que es responsable de la biosíntesis de proteínas, lo cual favorece a la formación de nuevas células. La fuente de fósforo es el  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , según Turpin (1986), aumenta el crecimiento de las microalgas mejorando la reacción oscura en *Selenastrum* sp. lo cual conduce a un rápido crecimiento. El  $\text{MgSO}_4$  y el  $\text{FeCl}_3$  promueven la actividad fotosintética de las células y por lo tanto aumenta el crecimiento de la microalga (Ilavarasi, Mubarakali, Praveenkuma, Baldey, & Thajuddin, 2011).

El carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) y silicato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) actúan como un tampón alcalino en el medio de cultivo. Además el  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  es la fuente de carbono en el medio Chu #10, según Sharma, Pal, & Sharma (2011), la presencia de este reactivo promueve la síntesis de clorofila, lo que ayuda al crecimiento de *C. vulgaris*, además actúa como un indicador sensible del estado fisiológico de la microalga. El  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se encuentra en el medio Chu #10 y en el medio BG-11 en una cantidad de 20 y 2 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. En el medio Chu #10 se encuentra en mayor proporción, lo que nos indica que se puede deber a este elemento importante, el éxito en el crecimiento de *Chlorella* sp. (Ver anexo A).

Una de las ventajas de utilizar el medio Chu #10, es que se emplea 6 reactivos para su elaboración, en comparación a los medios BG-11 y BBM, que aproximadamente se componen de entre 17 a 20 reactivos cada uno. Económicamente es más factible la utilización de este medio en los experimentos a escala laboratorio. Además otra ventaja de la utilización de

medios inorgánicos como el medio Chu #10 es que los resultados son constante en comparación a los medios de cultivos no convencionales como aguas residuales, agua de mar o de vertientes, ya que estos arrojan resultados muy variables que dependen del lugar de colecta, de la temporada del año y del tiempo de almacenamiento.

En investigaciones realizadas con cepas nativas Ecuatorianas de *Chlorella* sp., utilizando como medio de cultivo fertilizante foliar, reportan densidades celulares menores a las obtenidas en la presente investigación. Según Portilla (2010), el valor más alto de la densidad celular fue de  $4.71 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> en un medio con agua de vertiente complementado con 0.5 mL L<sup>-1</sup> Nitrofoska. Mientras que al utilizar el medio Chu #10 obtuvimos una densidad celular de  $4.51 \times 10^7$  cél mL<sup>-1</sup>.

#### **4.2.1 Productividad de la biomasa**

La productividad de biomasa para un cultivo de *Chlorella* sp. nativa, que creció bajo condiciones de cultivo óptimas para su crecimiento fue de 63.81 mg L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>. Sin embargo, este dato es mucho menor al obtenido por Portilla (2010), utilizando una cepa nativa de *Chlorella* sp., donde la productividad fue de 150 mg L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>. Según Brennan (2010), la productividad de *Chlorella* sp. alcanza un valor máximo de 32 mg L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, en fotobioreactores cerrados, siendo estos los más eficientes en cuestión de productividad. Los parámetros de productividad son muy dependientes en las condiciones de cultivo, por lo que es difícil comparar los resultados obtenido en el presente estudio con los obtenidos en cultivos en diferentes condiciones.

Estos resultados dependen mucho de las condiciones de cultivo, disponibilidad de nutrientes y principalmente de los métodos de cosecha utilizados. En nuestro caso el método de cosecha fue por floculación y filtrado,

donde es inevitable tener pérdidas de la biomasa en los filtros. El método más eficiente es el centrifugado, donde se evita perdidas de biomasa, pero no es recomendable utilizar al tener grandes cantidades de cultivo como fue este caso (Ruíz, 2011).

#### **4.3 ETAPA 2: Estrés nutricional de nitrógeno en *Chlorella* sp.**

Las microalgas de la división Chlorophyta, especialmente del género *Chlorella* sp. presentan una gran adaptabilidad a condiciones extremas de estrés y poseen diversos mecanismos para contrarrestar dichas dificultades (Córdoba, 2012). En el caso de la deficiencia de nitrógeno son múltiples las respuestas que manifiestan las microalgas, ya que es un elemento importante en la composición de muchas macromoléculas como las proteínas, clorofila y el ADN (Simionato, y otros, 2013). Por lo tanto la síntesis de proteína y clorofila se suspende, es decir no hay formación de nuevas células; y se priorizando la síntesis de moléculas de energía como carbohidratos y lípidos, que servirán para la conservación en condiciones desfavorables.

La reducción de la síntesis de clorofila se evidenció claramente en los cultivos del ensayo 2, ya que inicialmente eran de color verde intenso en condiciones normales y debido a la reducción de nitrógeno en el medio, se tornó amarillo a los 5 días de estrés (ver figura 2.9). Según Panchaa, y otros (2014), la disminución de nitrógeno redujo un 75.43 % el contenido de Clorofila a y b así como de carotenoides en *Scenedesmus* sp.

Los 5 tratamientos con disminución de las concentraciones de nitrógeno en el medio, fueron significativamente diferente, destacándose T1 al obtener una media de 2.15 % de lípidos. Es decir mientras menor es la cantidad de nitrógeno en el medio mayor será la acumulación de lípidos en las células.



Estos resultados se obtuvieron a pesar de bajo contenido lipídico en general en todos los tratamientos (ver anexo C).

La microalga *Chlorella* sp. nativa, en la etapa de estrés de nitrógeno no presentó una acumulación de lípidos, ya que en el estado con suficiente cantidad de nitrógeno el porcentaje lipídico fue de 5.99 %, y en el medio libre de nitrógeno (T1) el porcentaje lipídico fue de 2.15%. Esta respuesta puede deberse a que las microalgas sufren muchos cambios en el flujo de carbono, el cual compete en la síntesis de compuestos ricos en energía como los carbohidratos y los lípidos. Según Panchaa, y otros (2014), reportó que al reducir la concentración de nitratos de 247 a 30.87 mg L<sup>-1</sup> incremento en 1.39 veces el contenido total de carbohidratos mientras que no afectó a la biomasa ni al contenido de lípidos. Por lo tanto Li, Han, Sommerfeld, & Hu, (2011), sugirieron que las microalgas expuestas a condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno, prefieren la síntesis de carbohidratos y consecutivamente la de lípidos, no obstante los carbohidratos podrían convertirse en lípidos cuando las limitaciones de nitrógeno persisten.

Para la acumulación de lípidos en las microalgas, es indispensable que se efectúe el proceso de fotosíntesis y la fijación de carbono, con el propósito de producir acetil-CoA, que es el precursor de la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos (Córdoba, 2012). La relación entre carbono/nitrógeno debe ser de alrededor de 6:1 en estados de privación de nitrógeno, para llevar la ruta hacia los ácidos grasos (Woertz, Feffer, Lundquist, & Nelson, 2009). En el medio Chu #10 la única fuente de carbono es el Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, el cual no es suficiente para cumplir con la relación C/N, está podría ser la razón por la cual se presentó bajos porcentajes de lípidos en el ensayo 2.

En estudios realizados en el Laboratorio de Biotecnología Energética (BIOTEC), con consorcios microalgales, se ha reportado concentraciones

lipídicas de 2 hasta 3 por ciento. En la presente investigación con la utilización de *Chlorella* sp. nativa aislada del reservorio de agua de la EEQ, en semejantes condiciones de cultivo, se obtuvo un porcentaje de 5.99 en peso seco. Por tal razón *Chlorella* sp. nativa aislada del reservorio de la EEQ, se destaca a los consorcios utilizados por acumular mayor cantidad de lípidos.

#### **4.4 Perfil Lipídico: ETAPA 1 y 2**

El perfil de lipídico de los ensayos 1 y 2, manifestó un cambio importante en la composición de ácidos grasos. En el ensayo 1, es decir el cultivo en condiciones de equilibrio de nutrientes, presentó un 77.8% de ácidos grasos insaturados. En el ensayo 2, el cultivo en condiciones de deficiencia de nitrógeno en el medio, mostró un 79.8 % de ácidos grasos saturados. Estos ácidos grasos, presentan varias propiedades que pueden ser utilizados como materia prima y excipientes para varios fines medicinales e industriales (Venkata, y otros, 2011).

En la presente investigación *Chlorella* sp. nativa en condiciones de crecimiento optimas, se encontró que el 22 %, 25.9 % y 51.9 %, fueron ácidos grasos saturados (SAFA), monoinsaturados (MUFAs) y poliinsaturados (PUFAs), respectivamente. Resultados similares obtuvo Serrano (2012), en *Chlorella vulgaris*, donde registro 28.9% de SAFA, 12.1% de MUFAs y 59% de PUFAs. Estos resultados fueron ratificados por Alvear , Castillo , & Henao (2011), donde tambien trabajo con *Chlorella* sp. y presentó resultados semejantes, ya que obtuvo 94.1% ácidos grasos insaturados (UFA) y 5.89 de SAFA. Sin embargo, de acuerdo a Andrade Beltrán (2013) en el estudio con *Chlorella protothecoides* los resultados no fueron acordes con los antes mencionados, ya que se reportó en mayor cantidad, un 64.05% SAFA, un 21.8 % de MUFAs y 14.67 de PUFAs. La diversidad de los resultados se debe a que estos valores están relacionados directamente con parámetros de

crecimiento, como luz, temperatura, salinidad, cantidad de nutrientes entre otros.

En condiciones limitantes de nitrógeno (Etapa 2), hubo un importante cambio en la síntesis de ácidos grasos, ya que principalmente encontramos SAFA en un 79.8%, MUFAs en un 7.89 y PUFAs en un 12.2%. Datos similares encontró Chaichalerm, y otros, (2012) en *C. húmícola* donde el ácido palmítico, osciló entre el 35.96% y 41.78%; el resto era principalmente oleico y linoleico. La abundancia de los ácidos grasos saturados es de extrema importancia para la utilización como fuente de biodiesel, debido a que estos lípidos tienen mayor número de cetano (CN), también disminuyen las emisiones de NO<sub>x</sub>, tienen un menor tiempo de encendido y además una mejor estabilidad oxidativa (Arias , Martínez, & Cañizares , 2013)

La proporción de ácido palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1n9 cis ω9), linoleico (C18:2n6 cis ω6) y ácido eiosadienoico (C20:2), varió los porcentajes de la etapa 1 a la 2. El porcentaje de C16:0 se observó que aumento, ya que inicialmente en la etapa 1 fue de 22% y aumento a 79.8% en la etapa 2. El C16:1 al contrario, se redujo ya que vario de 8.5 a 3.75%; de igual manera el C18:1n9 cis ω9 donde fue de 17.4 a 5.63 %, también el C18:2n6 cis ω6, que en el ensayo 1 fue de 12.8 y disminuyó a 4.22% y el C20:2 que varió de 38.9 a 6.57%. El cambio en la proporción de los ácidos grasos frente a las limitaciones de nitrógeno, es muy notable ya que principalmente el ácido palmítico aumento considerablemente, lo cual es muy importante en la aplicaciones industriales principalmente como materia prima para la producción de biodiesel.

Actualmente, se han desarrollado investigaciones encaminadas hacia las aplicaciones de los ácidos grasos como componente funcional para el desarrollo de productos nutracéuticos y suplementos alimenticios. La ventaja

principal de utilizar estos ácidos grasos provenientes de microalgas es que no poseen el olor y sabor característico del aceite de pescado (Hejasi & Wijffels, 2004). Los principales ácidos utilizados en estas aplicaciones son los eicosapentaenoico (EPA) y los omega 3 ( $\omega$ -3) y 6 ( $\omega$ -6), se han demostrado que son importantes en el desarrollo y funcionamiento del cerebro, para problemas cardiovasculares, enfermedades inflamatorias y el cáncer (Córdoba, 2012). En *Chlorella* sp. nativa se encontró un 38.9% de EPA, muy superior a lo reportado por Breuer, Lamers, Martens, Draaisma, & Wijffels (2012), en *P. tricornutum* produjo un 22% y *P. cruentum* un 10%, durante el cultivo en condiciones de nitrógeno normales. Los ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 en el ensayo 1 y 2 se obtuvo en un 12.8% y 4.22% respectivamente, siendo más abundante en el cultivo de *Chlorella* sp. en concentraciones estándares de nitrógeno (Etapa 1).

## CAPÍTULO 5 : CONCLUSIONES

- Se aisló la microalga *Chlorella* sp. nativa proveniente del reservorio de agua de la EEQ, y su identificación se realizó mediante claves taxonómicas bajo el microscopio.
- Se determinó que el medio Chu #10 favorece el crecimiento de la microalga nativa *Chlorella* sp., ya que mostró un mayor número de células ( $4.51 \times 10^7$  cél mL<sup>-1</sup>), mayor velocidad de crecimiento ( $0.894$  d<sup>-1</sup>) y menor tiempo de duplicación de las células ( $0.775$  días).
- La microalga *Chlorella* sp. nativa, en la etapa de estrés de nitrógeno no presento una acumulación de lípidos, ya que en el estado con suficiente cantidad de nitrógeno el porcentaje lipídico fue de 5.99 %, y en el medio libre de nitrógeno el contenido de lípidos fue de 2.15%.
- El análisis del contenido lipídico en los 5 tratamientos, determinó mediante análisis estadístico, que el tratamiento 1 y 2 fueron los más promisorios en la acumulación de lípidos, a pesar del bajo contenido lipídico. Sin embargo T1 fue el que presento una media más alta de lípidos (2.15%).
- El cultivo de *Chlorella* sp. presentó una productividad de la biomasa de  $63.81$  mg L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, por lo tanto se determina que esta microalga es candidata recomendable para un cultivo a gran escala.
- *Chlorella* sp. en condiciones óptimas de crecimiento favoreció la síntesis de ácidos grasos insaturados (77.8%), los cuales son de gran importancia en el campo de la medicina y de la industria alimenticia.

- *Chlorella* sp. en condiciones de déficit de nitrógeno, favoreció la síntesis de los ácidos grasos saturados (79.8%), estos son utilizados como materia prima para la elaboración de biodiesel.

## CAPÍTULO 6 : RECOMENDACIONES

- Es importante la identificación a nivel de especie de *Chlorella* sp., lo cual facilita los estudios de las condiciones de crecimiento y las ruta de biosíntesis de las moléculas de interés biotecnológico.
- Profundizar el estudio de la deficiencia de nitrógeno, tomando en cuenta las concentraciones de carbono en el medio, ya que este elemento es de vital importancia para la acumulación de lípidos.
- Es importante el monitoreo de los lípidos en las células, mediante tinción con rojo Nilo y microscopio de fluorescencia, para determinar bajo qué condiciones la microalga produce mayor cantidad de estos metabolitos.
- Realizar un análisis del contenido de carbohidratos, posterior a la inducción del estrés de nitrógeno. Para determinar si la microalga optó por la síntesis de lípidos o de carbohidratos.
- Evaluar diferentes métodos de extracción lipídica, ya que cada especie de microalga se comporta diferente frente a los distintos solventes utilizados en este análisis.
- Se recomienda la utilización del medio Chu#10, como medio de cultivo a escala laboratorio de *Chlorella* sp. nativa.
- Se recomienda continuar con la investigación de esta cepa nativa, ya que demostró ser una fuente potencial de lípidos importantes en los

campos de la medicina, de la industria alimenticia y de las energías renovables.



## CAPÍTULO 7 : BIBLIOGRAFÍA

- Abalde, J., & Herrero, C. (2004). Microalgas en acuicultura: calidad nutricional. *Sociedad Española de Ficología*, 16-18.
- Albarracín, I. (2007). Microalgas: potenciales productoras de biodiesel. *XV Simposio electrónico internacional*, 1-9.
- Alvear , M., Castillo , C., & Henao, D. (2011). Evaluación del pH y concentraciones de nitrógeno en el cultivo de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella nativa* como fuente de aceite vegetal para la producción de biodiesel. Cartagena, Colombia.
- Andersen , R. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Hong Kong: Elsevier.
- Andrade Beltrán, M. I. (2013). Evaluación del potencial energético de la microalga *Chlorella protothecoides* en el Ecuador para la obtención de biocombustibles.
- Arias , M., Martínez, A., & Cañizares , R. (2013). Biodiesel Production from Microalgae: Cultivation Parameters that Affect Lipid Production. *Acta biol. Colomb*, 43- 68.
- Armendáriz, J. (2011). Producción de biodiesel por microalgas, como una estrategia de fuentes alternativas de energía. 1-98.
- Barreno, E., & Pérez, S. (2003). *Claves para la identificación de genero*. KRK.
- Bellinger, E., & Sigeo, D. (2010). *Freshwater Algae Identification and Use as Bioindicators*. New Delhi: Wiley- Blackwell.

- Bermeo, L. (2011). Estudio del cosechado de cultivo microalgal mediante técnicas de centrifugado. *uca*.
- Bernardino , J., Scott, J., Mendoza, C., Espinal, G., & Zapata , Z. (2008). Potencial de algas verdes para la producción fotobiológica de hidrógeno. *Ciencia y Sociedad*.
- Brenan, M., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae – A review of technologies for production processing, and extraction of biofuels and co. products. *Renewabl and Sustainable Energy*, 557-577.
- Breuer, G., Lamers, P., Martens, D., Draaisma, R., & Wijffels, R. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology*, 217-226.
- Cha, T., Chen, J., Goh, E., Aziz, A., & Loh, S. (2011). Differential regulation of fatty acid biosynthesis in two *Chlorella* species in response to nitrate treatments and the potential of binary blending microalgae. *Bioresource Technology*, 10633-10640.
- Chaichalerm, S., Pokethitiyook, P., Yuan, W., Meetam, M., Sritong, K., Pugkaew, W., . . . Damrongphol, P. (2012). Culture of microalgal strains isolated from natural habitats in Thailand in various enriched media. *Applied Energy*, 296-302.
- Chias, M., Lombardi, A., & Melao, M. (2013). Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 8.

- Colorado, M., Moreno , D., & Pérez, J. (2013). Desarrollo, producción y beneficio ambiental de la producción de microalgas. La experiencia en La Guajira, Colombia. *Ambiente y Desarrollo*, 113-126.
- Córdoba, N. (2012). Relación entre parámetros de proceso fotótrofo y la producción de lípidos de interés industrial en microalgas de la división chlorophyta. Bogota, Colombia.
- Dávila, A. (2013). Evaluación de las Condiciones de Cultivo Autotrófico de Microalgas Chlorella para la Producción de Biodiesel. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Estrada, E. (2011). Evaluación del cultivo de microalgas a nivel de la planta piloto para la extracción de aceites como materia prima en la producción de biodiesel. *Consejo nacional de ciencia y tecnología*.
- Faife, E., Otero, M., & Alvarez, A. (2012). Producción de biodiesel a partir de microorganismos oleaginosos. Una fuente de energía renovable. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 26-35.
- Farooq, W., Ryu, B., Lee, Y., Kim, B., Kim, H., Choi, Y., & Yang, J. (2013). Two-stage cultivation of two *Chlorella* sp. strains by simultaneous. *Bioresource Technology*, 230-238.
- Fernández, L., Montiel, J., Millán, A., & Badillo, J. (2012). Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Revista de sociedad, cultura y desarrollo sustentable*, 101-115.

- García, F., Jawiarczyk, N., González, C., Fernández, J., & Acién, F. (2012). Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteínas, carbohidratos y lípidos. *Rev Latinoam Biotechnol Amb Algal*, 147-161.
- Garibay, A., Vasquez, R., Sánchez, M., Serrano, L., & Martínez, A. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *Revista de la sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.*, 38-56.
- González, A. (2000). *Alternativas en el cultivo de microalgas*. Guayaquil.
- Griffiths, M., & Harrison, S. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 493-507.
- Hejasi, A., & Wijffels, R. (2004). Milking of microalgae. *Trends in Biotechnology*, 189-194.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 621–639.
- Ilavarasi, A., Mubarakali, D., Praveenkuma, E., Baldey, E., & Thajuddin, N. (2011). Optimization of various growth media to freshwater microalgae for biomass production. *Biotechnology*, 540-545.
- León, M. (2013). Aprovechamiento de lactosuero como enriquecedor de medios de cultivo para el crecimiento de cianobacterias. 1-20.

- Li, Y., Han, D., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2011). Photosynthetic carbón partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp.(Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresource Technology*, 123-129.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., & Lan, C. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Microbiology and Biotechnology*, 629-636.
- Lobban, C., Chapman, D., & Kremer, B. (1998). Experimental Phycology: A laboratory manual. *Cambridge University Press. Nueva York, EEUU*.
- Loera, M., & Olguín, E. (2010). Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel:. *Lattiinoam Biottecnoll Amb Allgal*, 91-111.
- Makareviciene, V., Andruleviciute, V., Skorupskaite, V., & Kasperoviciene, J. (2011). Cultivation of Microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. as a Potential Biofuel Feedstock. 1-26.
- Maldonado, E. (2014). Evaluación de la capacidad mixotrófica de la microalga *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*), con sustratos amiláceos. Sangolqui.
- Malgas. (2013). Aplicaciones de las microalga: Estado de la técnica. 1-59.
- Markou, G., & Nerantzis, E. (2013). Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances*, 1532–1542.

- Mata, T., Martins, A., & Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 217-232.
- Montes, J., & Pulido, M. (2012). Obtención de protocolos para el aislamiento, cultivo y extracción de ADN de *Chlorella vulgaris* Beyerinck. *El Astrolabio*, 46-54.
- Morales, E. (2013). Biotecnología Ambiental, Algal y Producción de Biomasa. *UCE*.
- Moronta, R., Mora, R., & Morales, E. (2002). Identificación de una especie de la microalga *Chlorella*, implementando pruebas morfológicas, bioquímicas y fisiológicas. Maracaibo.
- Ortiz, M., Cortés, C., Sánchez, J., & Otero, A. (2012). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotroficas y mixotroficas. *Orinoquia*, 1-25.
- Panchaa, I., Chokshia, K., George, B., Ghosha, T., Paliwala, C., Mauryaa, R., & Mishra, S. (2014). Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 146-154.
- Portilla, A. (2010). Evaluación del rendimiento de producción de aceite de cuatro microalgas de las provincias Ecuatorianas de Orellana, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha en diferentes condiciones de iluminación y medio de cultivo a nivel laboratorio. Sangolqui: Ecuador.

- Queiroz, M., Comas, A., Menezes, M., Castro, J., Pereira, S., & Andrade, I. (2012). Coleção de microalgas de ambientes dulciaquícolas naturais da Bahia, Brasil, como potencial fonte para a produção de biocombustíveis: uma abordagem taxonômica. *Acta Botanica Brasilica*, 691-696.
- Ratha, S., Prasanna, R., Prasad, R., Sarika, C., Dhar, D., & Saxena, A. (2013). Modulating lipid accumulation and composition in microalgae by biphasic nitrogen supplementation. *Aquaculture*, 69-76.
- Ratledge, C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochemical Society*, 1047-1049.
- Rodolfi, L., Chini, G., Padovani, G., Biondi, N., & Bonini, G. (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor masscultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 100-112.
- Ruíz, A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. 1-96.
- Salazar, L. (2012). Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel. *Universidad de Piura*, 1-108.
- Santos, A., González, Y., & Martín, C. (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. *Anales de mecánica y electricidad*, 20-28.

- Serrano, L. (2012). Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel. Bogotá.
- Sharma, R., Pal, G., & Sharma, V. (2011). Comparison of different media formulations on growth. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1-16.
- Simionato, D., Block, M., La Rocca, N., Jouhet, J., Maréchal, E., Finazzi, G., & Morosinotto, T. (2013). The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eukaryot Cell*, 665-676.
- Suali, E., & Sarbatly, R. (2012). Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 4316–4342.
- (2013). *Taller teórico práctico de Biotecnología en microalgas y cianobacterias*.
- TECNOPLADES . (2014). *Protocolos de microalgas*. Colima.
- Turpin, D. (1986). Growth rate dependent optimum ratios in *Selenastrum minutum* implication for competition co. existence and stability in phytoplankton community. *Phycol*, 94-102.
- Ugalde, P. (2011). Efectos de estrés abiótico en la producción de lípidos en *Chlorella* sp. y *Tetraselmis chuii*, importantes para la elaboración de Biodiesel. 1-120.



- Venkata, S., Devi , M., Mohanakrishna, G., Amarnath, N., Babu, M., & Sarma , P. (2011). Potential of mixed microalgae to harness biodiesel from ecological water bodies with simultaneous treatment. *Bioresour*, 1109-1117.
- Wehr, J., & Sheath, R. (2003). *Freshwater Algae of North America*. California: Elsevier Science.
- Woertz, I., Feffer , A., Lundquist, T., & Nelson , Y. (2009). Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. *Journal of Environmental Engineering*, 1115-1122.