



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 2

Neiva, 22 de julio de 2022

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

Neiva

El (Los) suscrito(s):

María Paula Díaz García con C.C. No. 1075297051

Autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado titulado Evaluación de la Producción de Lípidos a partir de las microalgas *Scenedesmus* sp y *Chlorella vulgaris* sometidas a estrés nutritivo, presentado y aprobado en el año 2022 como requisito para optar al título de Licenciatura en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología.

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que, con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma:

María Paula Díaz G.

Vigilada Mineducación



**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
GESTIÓN DE BIBLIOTECAS**



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

2 de 2

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO:

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Díaz García	María Paula

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Otero Paternina	Angélica
Valbuena Villareal	Rubén Darío

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Otero Paternina	Angélica

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Licenciatura en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología.

FACULTAD: Educación

PROGRAMA O POSGRADO: Licenciatura de Ciencias Naturales

CIUDAD: Neiva
PÁGINAS: 67

AÑO DE PRESENTACIÓN: 2022

NÚMERO DE

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	2 de 5
---------------	---------------------	----------------	----------	-----------------	-------------	---------------	---------------

Diagramas___ Fotografías__x_ Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general_x___
Grabados___ Láminas___ Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___
Retratos___ Sin ilustraciones___ Tablas o Cuadros_x_

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento:

MATERIAL ANEXO:

PREMIO O DISTINCIÓN (*En caso de ser LAUREADAS o Meritoria*):

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

Español

Inglés

- | | |
|----------------------|--------------|
| 1. Microalga | Microalgae |
| 2. Ácidos grasos | Fatty acids |
| 3. Lípidos | Lipids |
| 4. Crecimiento algal | Algal growth |
| 5. Nitratos | Nitrates |
| 6. Clorofila | Chlorophyll |

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

Las microalgas son organismos fotosintéticos que se pueden encontrar en aguas dulces y saladas, al tener limitaciones de nutrientes en su medio, provoca la acumulación de la biomasa y contenido lipídico en su estructura celular. Las microalgas contienen ácidos grasos como componente en su membrana, lo cual, normalmente se encuentran en los productos de almacenamiento, metabolitos y fuentes de energía. En esta investigación se cultivaron dos especies de microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp a diferentes concentraciones de nitratos con la finalidad de extraer lípidos por el método de Soxhlet., adicionalmente se calculó el crecimiento algal, tasa de crecimiento y clorofila a. Los resultados mostraron que los tratamientos tuvieron una relación directa con respecto al crecimiento algal y el uso de nitratos, siendo el segundo tratamiento T1 (9,5 g) el que



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	3 de 5
--------	--------------	---------	---	----------	------	--------	--------

presentó los mejores resultados en cuanto a crecimiento respecto al tercer tratamiento T3 (5,5g), tratamiento cuatro T4 (3,5g) y tratamiento cinco T5 (1,5g). Para la producción de lípidos, el tratamiento 5 (1,5g) fue el que mejor acumuló lípidos en las dos especies, *Scenedesmus* sp la que logró acumular mayor cantidad de lípidos en comparación a *Chlorella vulgaris* con un porcentaje de 16,02% y 8,51%; concluyendo que la concentración de nitratos es altamente significativa con respecto al porcentaje de lípidos, lo que se puede decir que a mayor concentración de nitratos menor será el porcentaje lipídico y viceversa.

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO

AP-BIB-FO-07

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

4 de 5

The microalgae are organisms photosynthetic that can be found in fresh and saltine water, when microalgae have nutrient limitations in their environment, it causes the accumulations of biomass and lipid content in their cellular structure. The Microalgae contain fatty acids as a component in their membrane, which are normally found is storage products, metabolites and energy sources. The objective of this research was to evaluate different concentrations of nitrate for the extraction of lipids in the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. The algal growth, growth rate and chlorophyll a were also evaluated. The results showed that the treatments had a direct relationship with respect to algal growth and the different concentrations of nitrates, T2 (9,5g) being the one that presented the best results in terms of growth compared to T3 (5,5g), T4 (3,5g) and T5 (1,5g). For the production of lipids, T5 (1,5) was the highest amount of lipids in the two species. The species that accumulated the highest amount of lipids was *Scenedesmus* sp with a result of 16,02% and *Chlorella vulgaris* with a result of 8,51%. Concluding that the concentration of nitrates is highly significant with respect to the percentage of lipids and higher the concentration of nitrate, the higher the lipid content, but the lower the algal growth.



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO


CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	5 de 5
---------------	---------------------	----------------	----------	-----------------	-------------	---------------	---------------

APROBACION DE LA TESIS

Nombre presidente Jurado: LUIS JAVIER NARVAEZ ZAMORA

Firma: 

Nombre Jurado: JHON FREDY CASTAÑEDA GÓMEZ

Firma:  CC 75 091 735

Nombre Jurado: ALCIDES POLANIA PATIÑO

Firma: 

Evaluación de la producción de lípidos a partir de las microalgas *Scenedesmus* sp y *Chlorella vulgaris* sometidas a estrés nutritivo.

Presentado por:

María Paula Díaz García

Facultad de Educación

Licenciatura en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

Directora

PhD. Angélica Otero Paternina

Co-Director

Rubén Darío Valbuena Villarreal

Neiva, Huila

Evaluación de la producción de lípidos a partir de las microalgas *Scenedesmus* sp y *Chlorella vulgaris* sometidas a estrés nutritivo.

Presentado por:

María Paula Díaz García

**PROYECTO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIADA EN
CIENCIAS NATURALES; FÍSICA, QUÍMICA Y BIOLOGÍA**

DIRECTORA DE TESIS

PhD. Angélica Otero Paternina

CO-DIRECTOR DE TESIS

Rubén Darío Valbuena Villarreal}

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

FACULTAD DE EDUCACIÓN

LIC. CIENCIAS NATURALES: FÍSICA, QUÍMICA Y BIOLOGÍA

NEIVA, HUILA

2021

Nota de aceptación

Jurado

Jurado

Neiva y Fecha (05, Julio, 2021)

Dedicatoria

Agradezco primeramente a Dios, mis padres, mi familia, a la profesora Beatriz Zapata por la oportunidad de trabajar en la ESRH, a la profesora Angélica Otero por compartir su conocimiento conmigo y por su paciencia, a la coordinadora del laboratorio de química Yeimis Johana Montealegre por su colaboración y acompañamiento, y a todos que aportaron un granito de arena para poder realizar este trabajo.

CONTENIDO

Resumen.....	7
Abstract.....	9
INTRODUCCIÓN	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
ANTECEDENTES	15
JUSTIFICACIÓN	17
MARCO TEÓRICO.....	20
Las Algas	20
Las microalgas	21
Clasificación Celular de las microalgas	22
Condiciones ambientales para el crecimiento de microalgas	25
OBJETIVOS	31
Objetivo general.....	31
Objetivos específicos	31
METODOLOGÍA	32
Cultivo de Microalgas.....	32
Densidad algal.....	36
Tasa promedio de crecimiento	37

Biomasa total	37
Contenido de clorofila <i>a</i>	38
Extracción de Biomasa Seca.....	39
Extracción y cuantificación de lípidos	42
Análisis estadísticos	44
RESULTADOS.....	45
Crecimiento algal de <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorella vulgaris</i> a partir de cinco concentraciones de nitrato de sodio.	45
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	53
Densidad celular y Tasa de crecimiento:	54
Clorofila <i>a</i> :	55
Contenido lipídico:.....	56
CONCLUSIONES	58
RECOMENDACIONES.....	60
REFERENCIAS.....	61

TABLA DE FIGURAS

Figura 1	33
Figura 2	34
Figura 3	36
Figura 4	39
Figura 5	40
Figura 6	40
Figura 7	41
Figura 8	41
Figura 9	42
Figura 10	47
Figura 11	49
Figura 12	50
Figura 13	50
Figura 14	51
Figura 15	51
Figura 16	52

Resumen

Las microalgas son organismos fotosintéticos que se pueden encontrar en aguas dulces y saladas, al tener limitaciones de nutrientes en su medio, provoca la acumulación de la biomasa y contenido lipídico en su estructura celular. Las microalgas contienen ácidos grasos como componente en su membrana, lo cual, normalmente se encuentran en los productos de almacenamiento, metabolitos y fuentes de energía. En esta investigación se cultivaron dos especies de microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp a diferentes concentraciones de nitratos con la finalidad de extraer lípidos por el método de Soxhlet., adicionalmente se calculó el crecimiento algal, tasa de crecimiento y clorofila a. Los resultados mostraron que los tratamientos tuvieron una relación directa con respecto al crecimiento algal y el uso de nitratos, siendo el segundo tratamiento T1 (9,5 g) el que presentó los mejores resultados en cuanto a crecimiento respecto al tercer tratamiento T3 (5,5g), tratamiento cuatro T4 (3,5g) y tratamiento cinco T5 (1,5g). La especie que mayor cantidad de lípidos acumuló fue *Scenedesmus* sp con un porcentaje de 16,02_% con el T5 concluyendo que a mayor concentración de nitrato mayor contenido lipídico, pero menor crecimiento algal.

Palabras claves: microalgas, ácidos grasos, lípidos, crecimiento algal y nitratos.

Abstract

The microalgae are organisms photosynthetic that can be found in fresh and saltine water, when microalgae have nutrient limitations in their environment, it causes the accumulations of biomass and lipid content in their cellular structure. The Microalgae contain fatty acids as a component in their membrane, which are normally found is storage products, metabolites and energy sources. The objective of this research was to evaluate different concentrations of nitrate for the extraction of lipids in the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. The algal growth, growth rate and chlorophyll a were also evaluated. The results showed that the treatments had a direct relationship with respect to algal growth and the different concentrations of nitrates, T2 (9,5g) being the one that presented the best results in terms of growth compared to T3 (5,5g), T4 (3,5g) and T5 (1,5g). The species that accumulated the highest amount of lipids was *Scenedesmus* sp with a result of 16,02% corresponding to T5 (1,5g), concluding that the higher the concentration of nitrate, the higher the lipid content, but the lower the algal growth.

Keywords: Microalgae, fatty acids, lipids, algal growth and nitrates,

INTRODUCCIÓN

La ficología es la rama de la biología que estudia las algas, éstas pueden ser microalgas y macroalgas. Las microalgas son algas eucariotas unicelulares que pueden crecer en aguas dulces o salobres, efluentes industriales y domésticos, marismas y humedales artificiales. Crecen fácilmente en diversos ambientes que contienen gran cantidad de nutrientes esenciales para su crecimiento o en condiciones extremas. Las microalgas presentan pigmentos fotosintéticos que le permiten realizar la fotosíntesis, es decir, fijan el CO_2 que hay en el ambiente y convierten la luz proveniente del sol en energía química, siendo una alternativa para la producción de biodiesel, ya que al ser las microalgas oleaginosas son consideradas como fuentes de biocombustibles contribuyendo al medio ambiente. Las microalgas pueden producir diferentes combustibles como el bioetanol, biodiesel y biometano, que al ser considerados combustibles limpios, no generan contaminantes al ambiente. Los biocombustibles provenientes de microalgas son llamados biocombustibles de tercera generación lo cual, se dan a partir de la extracción de lípidos y ácidos grasos que producen las células, cuando se someten a condiciones extremas; los métodos para la producción de biodiesel a partir de aceites microalgales se pueden hacer por transesterificación, fermentación o por procesos térmicos (Castillo et al, 2017).

Muchos estudios revelan que el uso de la biomasa de las microalgas para la producción de biodiesel tiene muchas ventajas, ya que no compiten con las industrias alimenticias para seres humanos y animales, además acumulan entre el 20 y 80% de triglicéridos en comparación con los cultivos oleaginosos. El biocombustible resultante es biodegradable y no es tóxico. Una de las desventajas es su alto costo en el proceso de la extracción de lípidos. En varias investigaciones han pretendido mejorar los métodos de extracción de lípidos y ácidos grasos para un mayor rendimiento en la obtención de biodiesel (Trinidad et al, 2013).

Con base a lo anterior, la producción de biodiesel a partir de microalgas pretende reemplazar a los combustibles fósiles, ya que son considerados como una fuente de combustibles renovables que contribuye al medio ambiente mitigando las emisiones de CO₂ en un 78% en comparación con las emisiones de diésel de petróleo. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue obtener lípidos a partir de la biomasa de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. variando la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo F/2 Guillard, usando cinco concentraciones de NaNO₃ (90, 75, 45, 20 y 15 mg L⁻¹) para determinar cuál de estas concentraciones era la más eficiente en la producción de lípidos, ya que al disminuir la cantidad de nitrógeno, aumenta la concentración de lípidos pero disminuye la densidad algal y por ende la biomasa. También se evaluaron la concentración algal, crecimiento y viabilidad celular.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos no vasculares eucariotas unicelulares que contienen clorofila “a” como su pigmento fotosintético oxigénico primario, otras contienen pigmentos carotenoides y biliproteínas que enmascaran el color. Estas microalgas se pueden localizar en aguas dulces o aguas saladas, salobres, aguas residuales o el suelo con una amplia escala de pH y nutrientes (Mata et al., 2010; Dawes, 1986).

Las microalgas son consideradas actualmente como una fuente de metabolitos o compuestos importantes industriales. Son los productores biológicos de lípidos más eficientes del planeta ya que es considerada como una fuente natural obtenida a partir de la biomasa. El uso de microalgas como fuente bioenergética es prometedor ya que el tiempo de crecimiento de las microalgas es corto, se puede obtener una buena cantidad de lípidos dependiendo de la especie y pueden crecer en aguas dulces y saladas (Palomino, 2013). A partir de las microalgas se pueden obtener una gran cantidad de sustancias, una de ellas es el bioetanol y el biodiesel, lo cual, son considerados biocombustibles limpios ya que reducen las emisiones de CO₂, hidrocarburos y SO_x, por lo tanto, generan menos contaminación al medio ambiente lo cual es uno de los problemas más importantes que se está viviendo hoy en día (Gonzales, 2011).

A nivel mundial y en recientes investigaciones la producción de microalgas como uso de biocombustible, especialmente biodiesel es considerado como el combustible de la tercera generación, es una de las investigaciones más prometedoras debido a factores económicos y medioambientales ya que la utilización de recursos renovables es esencial para el desarrollo sostenible, debido a que se han convertido en la prioridad con un 40% del consumo total de energía en el mundo (Salazar, 2012). La producción de biodiesel en microalgas es de gran interés ya que comprometen una elevada cantidad de aceite por unidad de área de cultivo en un tiempo

corto. Actualmente, se realizan varios estudios para evaluar distintos métodos para obtener una mayor cantidad de aceite de microalgas (Salazar, 2012). La producción de lípidos en microalgas es superior a cualquier otro vegetal utilizado como obtención de aceite. Estas investigaciones a nivel mundial están haciendo que cada día se implementen nuevas tecnologías para obtener una mayor cantidad de aceites y a partir de ahí, poder extraer el biodiésel (Salazar, 2012).

En Colombia, la producción de biocombustibles comenzó en el 2009 con la palma de aceite como materia prima (Federación Nacional de Biocombustible, sf). La obtención de biodiésel de tercera generación, es decir provenientes de microalgas, es una de las investigaciones que está tomando fuerza ya que existen varias investigaciones relacionadas con la obtención de biocombustibles a partir de microalgas. Colombia es un país que cuenta con todas las condiciones necesarias para el cultivo de microalgas con la finalidad de obtener biodiésel (Serrano, 2012). Debido a la gran contaminación que existe en Colombia, las emisiones de CO₂, SO_x, hidrocarburos, CO, NO_x, entre otros, son perjudiciales para la salud y para el medio ambiente lo cual son emitidas por la combustión de materiales como el carbón, derivados del petróleo, gas natural, leña y residuos vegetales, lo cual conlleva a generar problemas serios en el ambiente como es el caso del calentamiento global y el efecto invernadero. Así, el uso de biocombustibles, especialmente de tercera generación, ayuda de cierto modo a mitigar las emisiones de CO₂, CO, NO_x, SO_x e hidrocarburos, provenientes de la combustión. (Lombana et al, 2015)

La búsqueda de fuentes energéticas renovables para evitar que se siga aumentando la contaminación ambiental y el uso descontrolado de combustibles fósiles, hace que cada día se busquen nuevas alternativas que ayude al medio ambiente a mitigar la contaminación y consigo mismo el deterioro de la salud humana. Por consiguiente, el objetivo de esta investigación es

obtener lípidos a partir de dos especies de microalgas del género Clorofitas, sometiéndolas a condiciones de estrés, variando la concentración de nitrógeno para cuantificar cuál de estas dos especies de microalgas es más eficiente en la producción de lípidos, esto es con la finalidad de que en futuras investigaciones se pueda producir biodiesel a partir del lípido microalgal.

De acuerdo a lo anterior, se plantea la pregunta problema ¿cómo influye la concentración de nitrato de sodio en la formación de lípidos en dos especies de microalgas, *Scenedesmus* sp y *Chlorella vulgaris*? Para así, poder determinar la mejor concentración de nitrato y la especie con mayor capacidad para acumular lípidos.

ANTECEDENTES

Existen una gran cantidad de artículos a nivel mundial y nacional, -donde reportan estudios de la producción de **biodiésel** a partir del cultivo de microalgas. La búsqueda por contribuir al medio ambiente y encontrar nuevos métodos para obtener mayor cantidad de lípidos, hace que cada día se mejoren las técnicas y se hagan más investigaciones.

A continuación, se relacionaron estudios realizados para la obtención de lípidos con diferentes especies de microalgas.

Serrano (2012), evaluó la composición y capacidad de acumulación de lípidos en cuatro microalgas nativas, estas microalgas fueron cultivadas en medio BBM. Los resultados mostraron que los géneros de *Scenedesmus* y *Chlorella* presentaron la mayor productividad de lípidos de 18,8 y 4,9 mg. L⁻¹ día, respectivamente.

Salazar (2012), evaluó un protocolo de método de extracción de aceites de biomasa de microalgas para la obtención de biodiésel con tres especies de microalgas *Dunaliella tertiolecta*, *Chaetoceros calcitrans* y *Nannochloropsis* sp. Usaron los solventes hexano, propanol:hexano y cloroformo:metanol con diferentes métodos de extracción, los métodos de extracción usados en esta investigación fueron: Soxhlet, Ramos 2010, Bligh y Dyer (Folt et al, sf) y método Zhu. Reportando, que el método más eficiente para las tres especies fue Folt et al. Modificado I, Ramos 2010 modificado y Zhu alcanzando rendimientos de 25,15%, 22,92% y 25,44% en *Dunaliella tertiolecta* y de 16,27%, 18,84% y 18,50% en *Chaetoceros calcitrans*.

Pérez y Quishpi (2014), obtuvieron lípidos de cinco especies de microalgas, *Chlorella* y *Scenedesmus*. F.F especie 1, F.F especie 2 y especie H1. Estos autores evaluaron la efectividad de seis solventes para la extracción de lípidos usando el método de extracción Soxhlet. En su investigación observaron, que los dos solventes más eficientes fueron metanol:hexano (1:3) y

cloroformo:metanol (1:2) con una producción de contenidos de lípidos mayor al 13%, de igual manera reportaron que *Chlorella*, fue la microalga que produjo la mayor concentración de lípidos con un 20,37%, seguido de *Scenedesmus* con 20,10%. Además, al modificar las concentraciones del medio de cultivo observaron que la concentración de lípidos aumentó, pero disminuyó la productividad de la microalga.

Robles-Heredia et al (2015), evaluó la concentración de nitrógeno en dos especies de microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* para la producción de lípidos, cultivadas en varias concentraciones de nitrógeno (90, 60, 40 y 20 mg L⁻¹), inclusive en ausencia de nitrógeno, esto para promover un equilibrio entre el crecimiento celular y la acumulación de lípidos. Solo *C. vulgaris* presentó un aumento en la producción de lípidos, *S. obliquus* no presentó aumento significativo.

Ardila-Álvarez et al (2016), obtuvieron lípidos y carbohidratos a partir de la microalga *C. vulgaris* en cultivos alternativos variando las fuentes de carbono, fósforo, nitrógeno y microelementos. Los medios de cultivos se diseñaron a diferentes concentraciones de nitrato de sodio, fosfato de potasio y acetato de sodio/carbonato de amonio como fuente de carbono. Como resultados, obtuvieron que la concentración de los nutrientes en los medios mixotrópicos afectó la producción de metabolitos para el caso de la obtención de carbohidratos; para el caso de lípidos, el acetato no presentó ninguna afectación en la producción de este metabolito.

JUSTIFICACIÓN

El uso de microalgas a nivel mundial para la producción de biodiésel es una alternativa viable que se está promoviendo en estos tiempos por su gran contenido de lípidos y además porque no compite con los recursos de alimentos para humanos y animales lo cual, es considerado como un biocombustible de tercera generación ya que se obtiene **biodiésel** a partir de los lípidos de microalgas. El **biodiésel** es una alternativa para sustituir el diésel producido por combustión de fósiles o derivados del petróleo ya que genera menos emisiones de sulfatos, compuestos aromáticos, dióxido de carbono, monóxido de carbono, humo, entre otros y además porque es un combustible más limpio (Castillo et al., 2017).

En Colombia existen muchos estudios sobre producción de **biodiésel** en microalgas, lo cual estas investigaciones están tomando fuerza para implementar el biocombustible no solo de primera y segunda generación sino también de tercera generación ayudando al medio ambiente en disminuir la contaminación producido por la quema de fósiles (Serrano, 2012).

En el Huila, la producción de **biodiésel** ha tomado relevancia, debido a diferentes investigaciones realizadas por investigadores y estudiantes, obteniendo **biodiésel** a partir de residuos de aceites de cocina y de plantas oleaginosas. El Huila es un departamento en la cual sus tierras son muy óptimas para el crecimiento de las plantas, existen muchas especies de plantas oleaginosas que no necesitan de un suelo específico para su crecimiento, ejemplo la planta *Jatropha curcas L* puede crecer en cualquier tipo de suelos especialmente en los arenosos y drenados lo cual es usada para la obtención de **biodiésel** además el uso de microalgas para la producción de **biodiésel** no se ha implementado hasta el momento en el Huila, haciendo que este proyecto sea innovador. Por otra parte, en el departamento la conciencia ambiental ha venido

creciendo desde el 2016, apoyando e involucrando a los huilenses a talleres, campañas y diálogos en pro al medio ambiente (Gobernación del Huila, 2008; Diario del Huila, 2011).

Las microalgas tienen la capacidad de crecer rápidamente, sintetizar y acumular grandes cantidades de lípidos en algunas especies mediante condiciones extremas, la síntesis de estos, especialmente de triglicéridos (TG) anfipáticos puedan ser manipulados por cambios de las condiciones de cultivo, la deficiencia de nutrientes (nitrógeno, fosforo, azufre y silicio) hacen que las microalgas alteren sus rutas biosintéticas provocando que éstas acumulen, siendo los lípidos, los de mayor concentración (Trinidad et al., 2015; Ardila-Álvarez et al., 2016). Las microalgas oleaginosas tienen la capacidad de captar CO₂ de fuentes industriales y demandan menos áreas de los cultivos tradicionales, también tienen una mayor eficiencia fotosintética que las plantas superiores logrando convertir entre 2 y 8%, comparado con el de las plantas que es aproximadamente de 0,05%; tienen períodos de cosecha cortas y una tasa de crecimiento elevada y es fácil el cultivo ya que crecen en aguas dulces, saladas o lugares muy húmedos necesitando solo luz solar y nutrientes para su crecimiento (Trinidad et al., 2015; Cobos-Ruiz et al., 2015).

Según Zhu et al, (2013) es importante saber que “*el estudio de los factores, tales como el aislamiento de especies de microalgas, el mecanismo metabólico, las condiciones de cultivo y el modo de operación y el diseño de fotobiorreactor*” hace que se obtenga una mejor calidad de lípidos, lo cual ayuda a mejorar el biocombustible en este caso el biodiesel a partir del proceso de transesterificación. Según el tipo de especie así mismo producirá una cantidad de lípidos y ácidos grasos; las especies predominantes de microalgas para la obtención de lípidos según el Instituto de Investigación en Energías Solar (SERI) son: *Nannochloropsis salina* y *Dunaliella salina* que contienen una elevada concentración de ácidos grasos, pero la National Renewable Energy Laboratory -NREL- en Estados Unidos, reportó que *Dunaliella*, *Scenedesmus* y *Chlorella* son

los géneros más usados para la obtención de **biodiésel** ya que acumulan una buena cantidad de lípidos y ácidos grasos (Trinidad et al., 2015).

Para la extracción de **biodiésel**, los lípidos y los ácidos grasos deben ser extraídos de la biomasa microalgal, se usan varios tipos de solventes, normalmente se adicionan directamente a la biomasa seca, los solventes más usados son el hexano, etanol (96%) cloroformo-metanol o hexano-etanol, además no solo se pueden extraer lípidos y ácidos grasos, sino también otros tipos de metabolitos. Los métodos de extracción cada día van mejorando, el ultrasonido y microondas pueden llegar a mejorar la obtención de lípidos y ácidos grasos con un porcentaje de 50% a un 500% con bajos costos o moderados (Palomino, 2013).

Las dificultades ambientales causadas por los gases de efecto invernadero provocadas por el hombre especialmente por la quema de combustibles fósiles en plantas de energías, humos industriales y vehículos automotores hacen que contaminen el aire, el agua y el suelo provocando enfermedades y deterioro ambiental como es el caso del fenómeno del calentamiento global. Los principales contaminantes del aire emitidos son dióxido de carbono, óxidos de azufre, monóxido de carbono, óxido de nitrógeno, hidrocarburos y partículas que trae consigo mismo problemas ambientales (Secretaría del Estado de Medio Ambiente y Recursos Naturales, República Dominicana, 2001).

Por lo tanto, es necesario el uso de biocombustibles que reducen las emisiones de gases de efecto invernadero, lo cual contribuye al cambio climático y a reducir las enfermedades respiratorias crónicas. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue la extracción de lípidos a partir de las microalgas *Scenedesmus* sp y *Chlorella vulgaris* sometidas a estrés nutritivo, variando la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo F/2 Guillard, con fines futuros de obtener **biodiésel**.

MARCO TEÓRICO

Las Algas

Las algas son diversos organismos autótrofos de organización sencilla que contiene clorofila a, realizan la fotosíntesis oxigénica y pueden vivir en agua dulce o saladas o en ambientes muy húmedos. Cuando se habla de algas, se hace referencia a dos tipos de algas: las macroalgas y microalgas. Las macroalgas son organismos protistas fotosintéticos multicelulares de alto crecimiento, estas pueden ser marinas o de agua dulce, crecen muy rápido y siempre en ambientes con presencia de luz y nutrientes. Sus representantes son las algas verdes, pardas y rojas. Las microalgas son cuerpos microscópicos unicelulares que crecen en suspensiones de cuerpos de aguas. La mayoría poseen flagelos móviles de los cuales favorecen su traslado, estas se pueden clasificar como procariotas y eucariotas, se pueden dividir en varios grupos dependiendo de su taxonomía, incluyendo azul-verde, verde-amarillo, rojo, marrón y las algas de oro. Existen más de 50.000 especies de microalgas (Rashid et al, 2014; Salazar, 2012).

Según Barsanti y Gualtieri (2006), las algas se pueden clasificar en cuatro grupos según sus estrategias metabólicas: Heterotróficos obligados: son aquellas algas que utilizan de su medio compuestos químicos orgánicos para obtener fuentes de carbono y energía como sustratos. Los Fototróficos obligados son aquellas que obtienen los nutrientes a partir del proceso de la fotosíntesis absorbiendo los fotones de la luz obteniendo energía, además el agua y el dióxido de carbono adquirido forman las sustancias de carbono requerida para la sobrevivencia (Sánchez, 2020). Mixotróficos facultativos: son algas que pueden crecer como fotótrofos y como heterótrofos. Por último los mixotróficos obligados en donde el principal modo de nutrición es la fototrofia pero la fagotrofia y la osmotrofia poseen los nutrientes necesarios para su crecimiento (Barsanti y Gualtieri, 2006).

La reproducción de las algas puede ser vegetativa por la división de una sola célula, o por fragmentación de una colonia (Guamán y Gonzales, 2016). De manera asexual las microalgas producen esporas móviles y la reproducción de forma sexual, la hacen a partir de gametos (Barsanti y Gualtieri, 2006).

La duración del ciclo celular de las algas depende de la especie, bajo condiciones óptimas de crecimiento la duración del ciclo depende del tamaño celular, es decir, para el picoplancton, es el ciclo más corto y dura 2 horas para su crecimiento y el más largo es para las nanoplactónicas que dura 6 horas, por otro lado, el ciclo de microorganismos simples como los dinoflagelados y formas coloniales, tienen ciclos más largos (Guamán y Gonzáles, 2016).

El interés por las algas deriva en la importancia ecológica ya que son productores primarios en un ecosistema siendo el responsable del más del 50% de la producción primaria en el planeta, además de que son fijadoras de CO_2 mediante la fotosíntesis, liberando O_2 al ambiente. La fijación de nitrógeno atmosférico N_2 por las algas representan hasta el 85% del flujo neto en el bento, aunque esto puede variar dependiendo del río y las características fisicoquímicas del sistema y, además, las algas participan activamente en los ciclos biogeoquímicos proporcionando servicios ecosistémicos (Sigeo, 2005; Bojorge y Cantora, 2016; Werlinger, 2004).

Dentro de las principales divisiones de algas actualmente reconocidas se pueden mencionar: Chlorophyta, Rhodophyta, Glaucocystophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta, Heterokontophyta (Raphidophyta, Chrysophyta, Bacillariophyta, Xantophyta, Eustigmatophyta y Phaeophyta), Haptophyta, Cryptophyta y Dinophyta (Werlinger, 2004).

Las microalgas

Las microalgas son seres unicelulares que pueden ser procariotas y eucariotas fotosintéticos, capaces de sintetizar la energía solar en energía química con una eficiencia mucho mayor que el de las plantas (Ochoa et al, 2020). Las células procariotas carecen de organelos con membrana (las cianobacterias) y el resto de las algas son eucariotas y se caracterizan por presentar una pared celular compuesta por polisacáridos y de contener organelos rodeados por una membrana. Además, poseen una fina estructura de cloroplastos, flagelos y un núcleo en donde se encuentra el material genético (Guamán y Gonzáles, 2016).

En las microalgas, el número de taxones es elevado existiendo una gran cantidad de especies disponibles, hasta el momento se conocen 30.000 especies de microalgas sobrepasando los 10.000 de cianofíceas y clorofíceas. En la actualidad, solo se han estudiado 50 especies, por lo tanto, se abre la posibilidad de estudiar otras especies que pueden ser aprovechadas comercialmente (Cerón, 2013).

Clasificación Celular de las microalgas

Según Bellinger y Sigeo (2010), tomado de Guamán y Gonzáles (2016), el fitoplancton se puede clasificar en cuatro grupos dependiendo del tamaño: picoplancton (0,2 -2 μm), nanoplancton (2-20 μm), microplancton (20-200 μm) y macroplancton (> 200 μm).

Las microalgas son muy importantes en la naturaleza ya que ocasionan alteraciones en los ciclos biogeoquímicos de los elementos químicos ya que captan, asimilan y producen diferentes compuestos al ambiente. Ecológicamente, la materia orgánica reciclada a formas inorgánicas por medio de la mineralización en el fondo de los cuerpos de agua, hace que los nutrientes se limiten y sean esenciales para el crecimiento de las microalgas, lo que ocasiona un bajo crecimiento de microalgas; los nutrientes más limitados y esenciales para el crecimiento son

el nitrato NO_3^-), hierro, fosfato (PO_4^{3-}) y silicio disuelto en agua [$Si(OH)_4$], (Barsanti y Gualterie, 2006; Bellinger y Sigee, 2010).

Según Sipaúba y Rocha (2003), la curva de crecimiento microalgal está compuesta por cinco fases: fase de inducción (las células se adaptan a las nuevas condiciones del cultivo), fase exponencial (las células comienzan a dividir regularmente de una forma constante y varía según la especie), la fase de reducción de crecimiento (el tiempo requerido para la duplicación aumenta pero disminuye la tasa de crecimiento debido a la poca disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo), fase estacionaria (el factor limitante y la tasa de crecimiento están equilibrados, las densidades están relativamente constante) y la fase de declive (las células empiezan a morir).

Las algas verdes o Chlorophytas son el grupo más diverso de algas, existen alrededor de 7.000 especies de algas verdes, los cuales unas 800 son marinas, el resto se encuentra en agua dulces o ambientes terrestres. Las Chlorophytas se encuentran en el plancton de ecosistemas lénticos y lóticos con poco movimiento cuando los nutrientes, luz y temperatura son altos. Este grupo de microalgas tienen como principal característica la presencia de clorofila a y b en la misma proporción que las plantas siendo los causantes de su color verdoso. Sus principales pigmentos son los carotenoides y las xantófilas siendo la Luteína, el carotenoide principal. En este grupo hay diferentes géneros que incluyen los flagelados, cocoides, colonias no móviles, filamentosos, desmidos y géneros similares a plantas (Guamán y Gonzáles, 2016).

Las clorofíceas presentan reproducción vegetativa, esporica y gamética. La reproducción vegetativa es por división celular, pero también las algas se pueden reproducir a través de esporas (zoosporas y aplanósporas). Las clorofíceas presentan diferentes tipos de gametos según su morfología puede presentar isogamia, anisogamia y oogamia.

Según Chacón-Lee y Gonzáles-Mariño (2010), las especies de microalgas más usadas para aplicaciones biotecnológicas son: *Spirulina* sp., *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Odontella aurita*, *Porphyridium* sp., *Schizochytrium* sp., *Isochrysis* sp., que han sido usadas en varias áreas ya sea para la obtención de lípidos, ácidos grasos para usos de biocombustibles, carotenoides para antioxidantes, cosméticos, farmacéutico, proteínas, etc. Estas especies como muchas más que aún no se han investigado, tienen muchos usos en la parte biotecnológica que contribuye de forma positiva a muchas industrias con fines de usos terapéuticos.

Scenedesmus sp. es uno de los géneros más comunes de algas de agua dulce que comprende una gran variedad de especies y pertenece a la familia *Scenedesmaceae* (León, 2015). Son un género que forma colonias de 2-4-8-16 (32) células planas paralelas a lo largo de la pared celular (León, 2015). Son de forma cilíndrica y algunas son semilunares. Su reproducción es asexual y se encuentra en el fitoplancton de ríos, estanques y lagos, raras veces en aguas salobre (Guamán y Gonzáles, 2016; Pastor y Pozo, 2013). Por lo general, las células que se encuentran en los extremos poseen uno o dos espinas de 200 μm de longitud que sobresalen de sus esquinas exteriores (León, 2015). La temperatura óptima para su crecimiento varía entre 28 a 30°C dependiendo de la especie (Pastor y Pozo, 2013)

Las microalgas del género *Scenedesmus* constituye la microflora de una gran variedad de ambientes de agua dulce, en especial cuando tienen altas concentraciones de nutrientes, lo cual hacen que se desarrollen fácilmente evidenciando la capacidad cosmopolita de la microalga, siendo descrita 100 especies, muchas de los cuales crecen fácilmente en medios de cultivos. *Scenedesmus* es una de las microalgas que tiene la capacidad de producir una gran cantidad de lípidos en comparación con otros géneros y además estas cepas son usadas actualmente para la producción de biodiesel (Araujo y Vargas, 2017; Pastor y Pozo, 2013).

Chlorella sp., comprende el grupo de microalgas Clorofíceas que se caracterizan por ser cosmopolitas y frecuentes en lagos alcalinos, marinos y lagunas costeras (Astocondor et al, 2017). Son células esféricas, ovoides o elipsoidales, se pueden encontrar solitarias o formando colonias de hasta 64 células. Su reproducción se da por autosporas liberadas a través del rompimiento de la pared celular de la madre. Este género se puede encontrar distribuido en agua dulce y salada, en el suelo y en hábitats subaéreos como planctónica, edáficas o endosimbióticas (Guamán y Gonzáles, 2016). Muchas especies de *Chlorella sp* son eurihalinas (concentraciones grandes de sales en el agua) pero según la especie, así mismo varía la cantidad de tolerancia de salinidad (Acostocondor et al, 2017).

Chlorella vulgaris es un alga verde unicelular que tiene forma esférica, sin flagelo con un diámetro de 2-10 μm , esta especie crece rápidamente requiriendo solo dióxido de carbono, agua, luz y pequeñas cantidades de nutrientes, además puede ser cultivada *in vitro*. Pertenece al Phylum Chlorophyta, familia Chlorellaceae y es una de las especies más estudiada, debido a la versatilidad metabólica, permitiendo ser cultivada en condiciones mixotróficas como tratamiento de aguas residuales y heterotrófica para la obtención de aceites para biodiesel (Jiménez, 2017; Acostocondor et al, 2017).

Condiciones ambientales para el crecimiento de microalgas

Según Fuentes y Olivera (2017), las condiciones ambientales para el crecimiento de microalgas varían dependiendo de la especie, pero las condiciones más generales que deben tener las microalgas en el período de cosecha son las siguientes:

pH: los valores de pH varían dependiendo de la morfología de la microalga ya que cada especie tiene un rango diferente brindando su óptimo crecimiento. Es importante mantener los valores de pH requeridos por la especie del alga en márgenes que aseguren su buen desarrollo,

para esto se puede controlar adicionando bases o ácidos. El pH más óptimo para su crecimiento es de 8 para especies dulceacuícolas.

Iluminación: la luz es uno de los factores más importantes ya que al ser organismos fotosintéticos, necesitan la luz para poder realizar sus procesos metabólicos, sin este nutriente, la microalga podría tener daños estructurales y déficit de crecimiento.

Fotoperiodo: las exposiciones de luz consisten en ciclos de luminosidad y oscuridad ya que simulan el proceso natural de las microalgas para un mejor crecimiento.

Temperatura: la producción de microalgas está asociada directamente con la temperatura ya que es un factor importante para la velocidad de crecimiento y la producción óptima; el rango más aceptado para la producción de una microalga varía entre 20-30 °C, dependiendo de la especie.

Salinidad: Este es un factor limitante para las microalgas, ya que, en muchas investigaciones, la salinidad es un factor importante para el crecimiento. Según el tipo de especie y la morfología, las microalgas reaccionan de forma diferente a la salinidad viéndose afectada las funciones de rendimiento de producción.

Medios de cultivos: Los nutrientes esenciales de la microalga radica en el medio de cultivo que se va a usar y con las concentraciones necesarias para su crecimiento, por lo tanto, los nutrientes fundamentales que debe tener un medio de cultivo son: sulfatos, cloruros, calcio, sodio, magnesio, potasio, entre otros; pero los nutrientes principales son el nitrógeno, carbono y fosforo. En la tabla 1, se muestran los nutrientes y las condiciones ambientales de crecimiento de las microalgas, teniendo en cuenta los requerimientos particulares para cada especie (Fuentes y Olivera, 2017).

Tabla 1

Nutrientes y condiciones ambientales de crecimiento de las microalgas

	Requerimientos	Compuestos químicos	Valores
Físicos	Luz		2,000-4,000 lux
	Temperatura		15-22 °C
	Salinidad		0,37%
	pH		7-9
	Redox		
Nutritivos	C	$CO_2CO_3^-$	g/100 mL
	O, H	O_2H_2O	g/100 mL
	N	$N_2NH_4^+ NH_3$	g/100 mL
	P	PO_4^-	g/100 mL
	S	SO_4^-	g/100 mL
	Na, K, Ca, Mg	Sales	g/100 mL
	Fe, Zn, Mn, B, Br, Si	Sales	mg/100 mL
	Cu, Co, Cl, I, Sr, Rb, Al, et.	Sales	µg/100 mL
	Vitaminas	B_{12} , tiamina, biotina	µg/100 mL

Fuente: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB473S/AB473S02.htm> Tomado de (Fuentes y Olivera 2017)

Nota: En la siguiente tabla se puede presenciar los nutrientes necesarios para el crecimiento óptimo de las microalgas.

La acumulación de lípidos en microalgas se debe a la ausencia de un nutriente en el medio, lo cual se convierte en un factor limitante para el crecimiento. La mejor forma de obtener una mayor cantidad de lípidos es limitando la cantidad de nitrógeno, ya que es inversamente proporcional a la productividad global de aceite de cultivo, ya que si se limita la concentración de nitrógeno, mayor cantidad de lípido se obtendrá, y obliga al organismo a usar otras rutas metabólicas para así mismo producir lo que necesita para su sobrevivencia, lo cual la biosíntesis de lípidos se realiza en los cloroplastos (Castillo et al, 2017; Salazar, 2012).

Una de las dificultades para la obtención de lípidos intracelularmente a partir de microalgas, es la pared celular debido a su dureza y difícil penetrabilidad, por ello, se han investigado varios métodos de extracción de lípidos rompiendo la pared celular y extrayendo el

aceite algal. Los métodos de rompimiento microalgal pueden ser térmicos, enzimáticos, mecánicos y químicos; una de las desventajas de estos métodos es que se necesita una cantidad grande de biomasa algal (Serrano, 2012).

Según Fuentes y Olivera (2017), la obtención de lípidos de microalgas en el laboratorio, se puede dar a partir de métodos de extracción y solventes que han logrado obtener una cantidad favorable de aceite de microalgas, para su uso correspondiente, lo cual, depende de la especie de microalga y del tipo de solvente y método que se use, a continuación, se mencionarán algunos métodos usados para la extracción de lípidos de microalgas.

- **Microondas:** Las microondas afectan la polaridad de los lípidos, provocando que haya entre las moléculas efectos de fricción debilitando las paredes celulares y por lo tanto rompiéndola para obtener la biomasa con ayuda de solventes naturales (Fuentes y Olivera, 2017).
- **Choque Osmótico:** La técnica consiste en un llenado rápido y esporádico de agua en el interior de la célula por medio de ósmosis provocando fraccionamiento (Fuentes y Olivera, 2017).
- **Autoclave:** este método consta de altas presiones y temperaturas lo cual degrada los lípidos a partir de la destrucción celular obteniendo muestras húmedas y sin un mayor riesgo de posibilidad de contaminantes que pueda alterar la muestra (Fuentes y Olivera, 2017).
- **Soxhlet:** según Fuentes y Olivera (2017), *“el método se Soxhlet consta de un balón esmerilado que contiene un solvente que es llevado hasta su punto de ebullición, ya que los lípidos de microalgas son sumamente solubles en solventes no polares como el hexano, por lo que concierne un cambio de estado líquido a gaseoso, el*

cual atravesará una cámara cuyo mecanismo de condensación que refrigerará al sistema permitiendo que se deposite el solvente en la muestra de la biomasa y gracias a un brazo de recirculación (sifón) ayuda a recuperar el solvente utilizado para la extracción y llevándolo nuevamente al balón esmerilado para comenzar de nuevo el ciclo hasta que se haya observado la decoloración de solvente utilizado. Dando a entender que por medio de lavados consecutivos se pueden extraer aceites a partir de la muestra sólida que se desea trabajar, pero con la desventaja que es un proceso extendido y costoso.”

- Bligh & Dyer: este método se hace con metanol: cloroformo (2:1) que consiste en la generación de homogenización de la biomasa en términos de tiempo que constituya una fase miscible con el agua, separando así el medio de dos fases a través de un proceso de filtración y centrifugación que asegura la separación de la fase de metanol y cloroformo, con un aumento de temperatura, donde se espera que el cloroformo se evapore para obtener solo el lípido (Fuentes y Olivera, 2017).

Como consecuencia de la quema de fósiles, la contaminación atmosférica ha sido uno de los problemas ambientales más importantes a nivel mundial, ya que las emisiones de CO_2 a la atmósfera causantes del cambio climático ha incentivado a muchas industrias a usar alternativas para contribuir a esta contaminación y por ende, los combustibles de tercera generación que son los que provienen de microalgas facilitando el control de emisiones de CO_2 mediante la absorción y fijación de este gas, produciendo biocombustibles tales como: bioetanol, biometano, biohidrógeno, biodiesel, etc. Además, de que muchas especies de microalgas tienen la capacidad de acumular grandes cantidades de lípidos y ácidos grasos en condiciones extremas para su sobrevivencia. Según el Instituto de Investigación en Energía Solar (SERI) y el NREL las

especies más prometedoras para la obtención de lípidos son *Nannochloropsis salina*, *Dunaliella salina*, y en géneros *Dunaliella*, *Scenedesmus* y *Chlorella*, esto es con el fin de producir biodiesel. Hasta el momento, no se conoce una cepa de microalga capaz de satisfacer al mismo tiempo todos los requisitos que permitan considerarla como materia prima óptima para la producción de biocombustible (Trinidad et al, 2013; Gonzales et al, 2011; Soledad y Rubio, 2018).

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar la producción de lípidos en las microalgas *Scenedesmus* sp y *Chlorella vulgaris* sometiéndolas a estrés nutritivo.

Objetivos específicos

- Determinar la cantidad de lípidos totales de *Scenedesmus* sp y *Chlorella vulgaris*, sometiendo las microalgas a condiciones de estrés modificando las concentraciones de nitratos en el medio F/2 Guillard.
- Determinar la tasa de crecimiento de estas dos especies variando las concentraciones de nitratos a través de espectrofotometría y el hemocitómetro.

METODOLOGÍA

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Alimento Vivo de la Estación Experimental Surcolombiana de Recursos Hidrobiológicos, localizado en el municipio de Palermo-Huila, vereda San Miguel a 9 kilómetros de la ciudad de Neiva.

El enfoque de esta investigación fue de carácter cuantitativo y tuvo un tipo de diseño experimental. Es cuantitativo debido a que es secuencial y se hizo análisis estadísticos y es de tipo experimental porque se controlaron las variables a través de la comparación con una muestra control. La investigación se realizó en dos fases: cultivo de microalgas y extracción de lípidos.

Cultivo de Microalgas

Para el cultivo se usaron dos especies de microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. Estas fueron suministradas por el Laboratorio de Alimento Vivo de la Estación Experimental Surcolombiana de Recursos Hidrológicos (Neiva-Huila, Colombia). Estas dos especies fueron cultivadas en medio de cultivo F/2 Guillard con modificaciones. Los cultivos fueron realizados en recipientes de vidrios de 3 litros previamente esterilizados en autoclave con una densidad algal inicial de $30.000 \text{ células. mL}^{-1}$. La siembra se realizó bajo condiciones axénicas utilizando una cabina de flujo laminar.

El sistema de cultivo que se usó fue semicontinuo, lo cual consistió en mantener las células en un volumen y aireación constante a una temperatura de $20,0 \pm 1,0 \text{ °C}$ e iluminación con lámparas fluorescentes y una intensidad lumínica de 60 a 70 Watts (Otero, 2010). En la figura 1, 2 y 3 se observan los cultivos de las especies *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* a diferentes concentraciones de nitratos y en diferentes tiempos. En la figura 1 se puede observar las diferentes coloraciones de los medios de cultivos en diferentes días y con diferentes tratamientos

siendo la figura a) correspondiente al día seis y se observa su crecimiento por medio del color, y en la figura b) correspondiente al último día (día 15), observando su color verde en los medios. El mismo procedimiento se realizó con *Chlorella vulgaris* tal como se observa en la figura 2 que corresponde al día 1.

Figura 1

Cultivos de Scenedesmus sp.



Nota. Medios de cultivos de *Scenedesmus sp* con diferentes concentraciones de nitrato y en diferentes tiempos. a) Cultivo al día 6; b) cultivo correspondiente al día 15.

Figura 2*Cultivo de Chlorella vulgaris*

Nota. Medios de cultivos de *Chlorella vulgaris* con diferentes tratamientos (día 1 de siembra).

Para evaluar la respuesta de *C. vulgaris* y *Scenedesmus* sp. en condiciones del medio de cultivo F/2 Guillard se tuvo en cuenta la concentración algal, crecimiento y viabilidad celular. Para la determinación de concentración algal se compararon dos métodos: concentración algal por medio del método hemocitómetro usando cámara de Neubauer y densidad medida por espectrofotometría determinando clorofila siguiendo la técnica de Sipaubá-Tavares y Rocha (2001) citado de Otero (2010).

El medio de cultivo que se usó fue F/2 Guillard con modificaciones, cuya composición se muestra a continuación:

Tabla 2*Composición del Medio de Cultivo F/2 Guillard Modificado*

Macronutrientes	Cantidad para la solución Stock	Agua destilada
NaNO ₃	7,5 g	100 mL
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,5 g	100 mL
Micronutrientes		
CuSO ₄ 7H ₂ O	10,09 mg	500 ml
ZnSO ₄ 7H ₂ O	20,15 mg	500 mL
CoCl ₂ 6H ₂ O	102mg	500 mL
MnCl ₂ 4H ₂ O	181m g	500 mL
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	6,3 mg	500 mL
Na ₂ EDTA	4, 36 g	500 mL
FeCl ₃ 6H ₂ O	3,15 g	500 mL
Vitaminas		
Complejo B	1 ml	1 L

Nota. Concentración de micronutrientes, macronutrientes y vitaminas usadas en el medio de cultivo para la siembra de las microalgas en el laboratorio. *Tomado de Otero (2010).*

Las concentraciones de nitratos usadas en el medio F/2 Guillard para el cultivo de microalgas fue descrito por Robles-Heredia et al, (2015) modificado. Para la investigación se usó cinco concentraciones de nitrato en el medio de cultivo, en este caso se usó el nitrato de sodio (NaNO₃) y por cada tratamiento se realizaron tres réplicas. En la tabla 3 se describe las concentraciones usadas en este estudio.

Tabla 3*Concentración de NaNO₃ en los Tratamientos Usados*

Tratamiento	Concentración de NaNO₃ (g/ 100 ml)	Adición por cada 1L de medio
T1	9,5	1 mL
T2	7,5	1 mL
T3	5,5	1 mL
T4	3,5	1 mL
T5	1,5	1 mL

Nota. Concentraciones de NaNO₃ preparadas para las soluciones stock de cada tratamiento.

El nitrógeno al ser un nutriente importante para las microalgas, éste se incorpora como nitrato (NO_3) o como amonio (NH_4) en los medios de cultivos de microalgas (Pérez y Labbé, 2014). Una vez realizada la siembra de microalgas, se procedió a determinar la densidad algal.

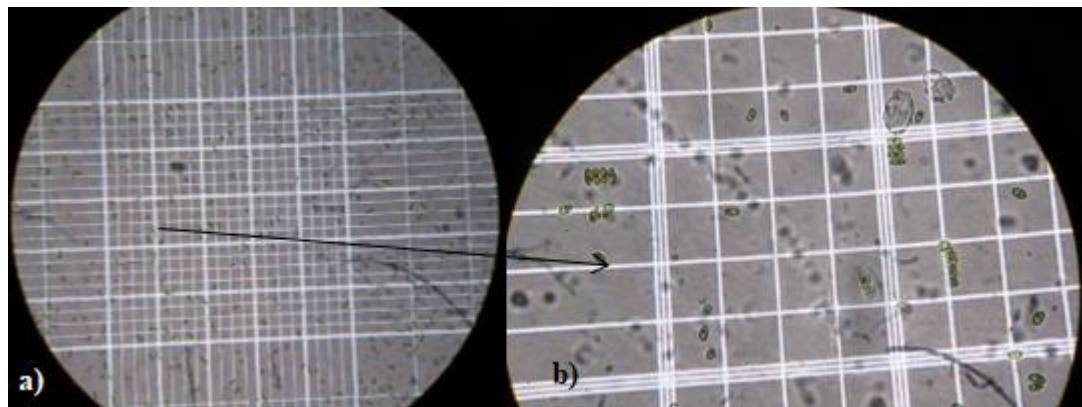
Densidad algal

El crecimiento algal fue determinado mediante recuento en cámara de Neubauer (Brightline “Boeco®”). Este procedimiento se realizó cada dos días por 15 días bajo un microscopio óptico (“Nikon®” Eclipse E200, 40X). El conteo se realizó por duplicado para cada réplica. Para disminuir el error del método se calculó el promedio de los recuentos y se utilizó la siguiente fórmula para determinar la densidad algal (Otero et al, 2013):

$$\text{Conteo algal} = \frac{\text{No de células contadas}}{10 * 4x10^{-6}}$$

Figura 3

Cuadrícula de la Cámara Neubauer.



Nota. Cuadrícula de la cámara de Neubauer usada para el conteo microalgal. En la figura a) se encuentra a un objetivo de 10X; figura b) objetivo de 40X

Tasa promedio de crecimiento

Es el incremento logarítmico de la biomasa durante la duración del ensayo. Utilizando la metodología de Otero et al, (2013) se empleó la siguiente fórmula:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_f - \ln X_i}{t_f - t_i} (\text{día}^{-1})$$

Donde:

μ_{i-j} = promedio de tasa de crecimiento específico desde el tiempo i a j

X_i = es la biomasa al tiempo i

X_f = es la biomasa al tiempo f

Biomasa total

Se calculó teniendo en cuenta la fórmula usada por Otero et al, (2013), en donde se obtuvo la biomasa al final tanto del grupo de control como de los tratamientos menos la biomasa inicial de cada uno en el ensayo.

$$B_t = B_f - B_i$$

Una vez realizado el conteo en todos los tratamientos, se procedió a extraer la clorofila *a*, a través de una bomba de vacío, papel filtro (Glass fibre prefilter). Una vez extraída la clorofila en el papel filtro, éste se almacenó en papel aluminio y conservado en la nevera convencional para su posterior análisis.

Contenido de clorofila *a*.

La extracción de clorofila se realizó cada dos días, al mismo tiempo que se realizaba el conteo algal. Este procedimiento consistió en extraer 50 ml de medio de cultivo, posteriormente éste se filtraba con una bomba de vacío y el filtrado se conservaba en la nevera por un período de 24 h. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a macerar el papel filtro con el extracto y 10 ml de acetona al 90% logrando su dilución.

Finalmente, el extracto fue transferido a un tubo de ensayo, el cual fue recubierto con aluminio, luego se guardó en la nevera convencional a 4°C por 24 horas. Trascurrido este tiempo los tubos de ensayo se sacaron de la nevera y se dejaron hasta que alcanzaran la temperatura ambiente y luego se procedió a determinar la absorbancia del sobrenadante con la ayuda de un Espectrofotómetro UV-Vis Perkin-Elmer Lambda 35. Las longitudes de ondas utilizadas fueron: 630, 645, 665 y 750 nm. Finalmente, con los datos de absorbancia se determinó el contenido de clorofila *a* usando la fórmula por Strickland y Parsons (1972):

$$C = (11.6 \times A_{665}) - (1.31 \times A_{645}) - (0.14 \times A_{630})$$

Cálculo de clorofila *a* (mg/m³ o µg/L)

$Cla = C/V \times 10/L \times S/10$ Donde,

Cla: clorofila *a*

C: fórmula de Strickland y Parsons

V: volumen de la muestra de agua filtrada (0,05 L)

L: longitud de la boca de la cubeta (1 cm)

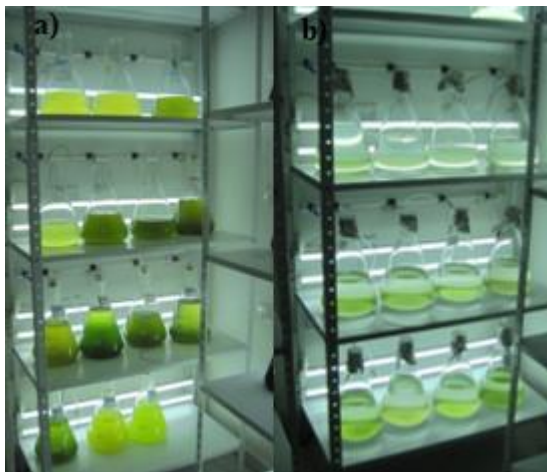
S: volumen de la acetona (0.01 L)

Extracción de Biomasa Seca

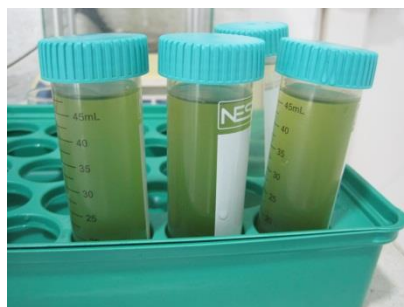
Alcanzada la etapa estacionaria del cultivo se procedió a desconectar los aireadores y se dejó decantar los medios por 4 horas (ver figura 4), luego se tomó diferentes tubos de ensayo y se trasvasó 45 ml del medio para luego proceder a centrifugar por 5 a 10 minutos a 3000 rpm (revoluciones por minuto) para obtener la biomasa húmeda. La biomasa se transfirió a pequeñas cajas de Petri de vidrio esterilizadas para luego ser introducidas al horno (ver figura 6).

Figura 4

Medios de Cultivos en Decantación



Nota. Medios de cultivos de *Scenedesmus* sp con el método físico de decantación. En la figura a) se observa el medio con pocas horas en decantación; la figura b) los mismos medios ya pasados por dos decantaciones.

Figura 5*Microalgas para Centrifugar*

Nota. Medios de cultivos trasvasados en recipientes de 10 ml para luego ser centrifugados.

Figura 6*Biomasa Húmeda*

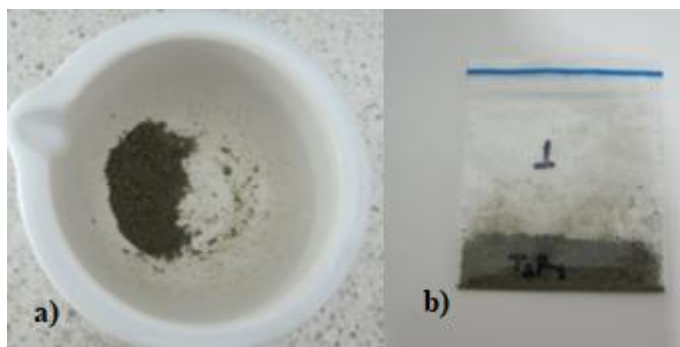
Nota. Biomasa húmeda extraída de los medios de cultivos una vez centrifugada.

Las cajas de Petri se pusieron al horno a 60°C por 24 horas hasta que se obtuvo la biomasa seca, tal como se observa en la figura 7.

Figura 7*Biomasa Seca*

Nota. Biomasa seca de diferentes tratamientos luego de estar expuestos al calor.

La biomasa seca se maceró hasta obtener un polvillo fino, lo cual fue guardado en bolsas Ziploc pequeñas (ver figura 8) y conservadas en un desecador para evitar contaminación y humedad.

Figura 8*Biomasa Seca de Scenedesmus sp.*

Nota. Biomasa seca luego de ser macerada. Figura a) biomasa seca en el mortero; figura b) biomasa seca guardadas en bolsas Ziploc.

Extracción y cuantificación de lípidos

La extracción de lípidos fue realizada en el laboratorio de experimentación de la Estación Experimental de Recursos Hidrobiológicos de la Universidad Surcolombiana por el método de Soxhlet usando el equipo Soxtec™ 2043.

Figura 9

Equipo Soxtec™ 2043.



El equipo cuenta con cuatro ciclos diferentes en una duración de tiempo de 9 horas para la extracción de lípidos. La extracción se realizó mediante tres réplicas para cada tratamiento con una cantidad de biomasa seca de aproximadamente 0,5 gramos. Se usó como compuesto orgánico 50 ml de éter de petróleo. Los recipientes y el algodón fueron previamente esterilizados y desengrasados. Una vez terminado el tiempo se procedió a pesar los recipientes con la grasa extraída y éste se anotó en un formato de la estación ESRH. Finalmente, se determinó el contenido lipídico mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ grasa cruda} = \frac{m2 - m1}{m * 100}$$

Donde m: masa de la muestra

m1: masa del matraz vacío

m2: masa del matraz con grasa

Análisis estadísticos

Los datos fueron descritos como media \pm error estándar de la media (ESM) por triplicado. Posteriormente, para analizar los efectos de los tratamientos sobre las variables: % Lípidos, densidad celular y clorofila-a, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores 2 x 5 (factor 1: especie y factor 2: concentraciones de nitratos) verificando previamente los supuestos de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (Bartlett). Se utilizó la prueba de Tukey para comparar las medias entre los diferentes tratamientos, como prueba a posteriori. Para todos los análisis se asumieron niveles de significancia del 95 % ($p < 0,05$). Los análisis estadísticos fueron realizados usando el software R (ver. 4.0.2).

RESULTADOS

Crecimiento algal de *Scenedesmus sp.* y *Chlorella vulgaris* a partir de cinco concentraciones de nitrato de sodio.

Los resultados mostraron que los tratamientos tuvieron una relación directa con respecto al crecimiento algal y el uso de nitratos, siendo el T1 (9,5g) el que presentó los mejores resultados en cuanto al crecimiento durante los primeros días de cultivo para ambas microalgas con respecto a los T3 (5,5g), T4 (3,5g) y T5 (1,5g), además tuvo un promedio de densidad algal para el día dos de aproximadamente $0,19 \times 10^6$ células/ ml para *Scenedesmus sp* y para *C. vulgaris* de $2,8 \times 10^6$ células/ml. Los mayores registros de densidad para el T3, T4 y T5 se presentaron en el transcurso de los días, especialmente en el día seis.

Tabla 4

Crecimiento algal durante la fase experimental

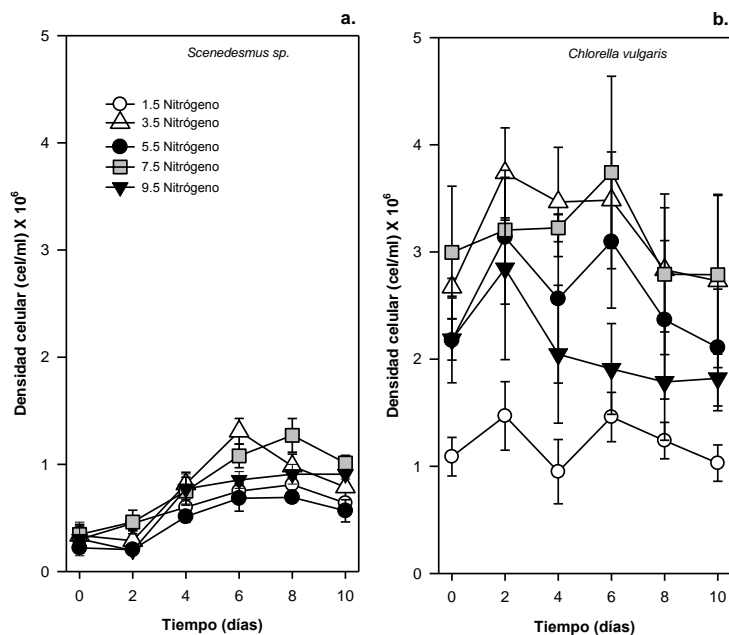
Día	<i>Chlorella vulgaris</i>					<i>Scenedesmus sp</i>				
	Concentración Nitrógeno					Concentración Nitrógeno				
	1,5	3,5	5,5	7,5	9,5	1,5	3,5	5,5	7,5	9,5
0	1,09±0,18	2,67±0,08	2,18±0,4	3±1,07	2,18±0,19	0,3±0,11	0,34±0,1	0,22±0,05	0,35±0,08	0,3±0,16
2	1,47±0,65	3,74±0,42	3,14±0,62	3,2±0,16	2,85±0,85	0,45±0,06	0,29±0,09	0,2±0,01	0,46±0,21	0,2±0,01
4	0,95±0,3	3,47±0,51	2,56±0,79	3,23±0,22	2,05±0,64	0,6±0,07	0,82±0,21	0,51±0,05	0,75±0,13	0,77±0,28
6	1,46±0,23	3,48±0,9	3,1±1,23	3,74±1,55	1,91±0,42	0,75±0,07	1,31±0,25	0,68±0,24	1,08±0,22	0,85±0,08
8	1,24±0,17	2,83±0,58	2,37±0,74	2,79±1,3	1,79±0,54	0,81±0,07	0,98±0,11	0,69±0,05	1,27±0,16	0,91±0,09
10	1,03±0,17	2,73±0,81	2,11±0,55	2,79±1,28	1,82±0,3	0,64±0,11	0,79±0,03	0,57±0,1	1,01±0,07	0,91±0,05

Nota. Valores diarios de crecimiento (cel x10⁶/ml) para las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* durante la fase experimental en medio de cultivo F/2 Guillard a diferentes concentraciones de Nitratos (datos expresados como promedio ± error estándar de la media; n=3).

Para la especie *Scenedesmus sp.* se pudo observar que el nitrato de sodio tuvo menor incidencia en el cultivo, visualizando un crecimiento lento comparado con *C. vulgaris*, además, todos los tratamientos con nitratos tuvieron poca incidencia en los cultivos, siendo el día 6 el pico más alto de densidad algal y luego las microalgas tuvieron un equilibrio de crecimiento indicando la etapa estacionaria. Para el día seis la densidad algal para el T4 (3,5g) fue el que mayor incidencia tuvo con respecto al tratamiento de control (T2), con una densidad algal de $1,4 \times 10^6$ células/ml aproximadamente, siendo el más alto en todo el experimento; seguido del T1 (9,5 g) con una densidad algal en el mismo día de $0,86 \times 10^6$ células/ml, y alcanzando un valor promedio máximo de densidad algal de $0,91 \times 10^6$ células/ml, correspondiente al día 8. El tratamiento T3 (5,5g) fue el que menor valor promedio de densidad algal tuvo en todo el experimento, junto con el tratamiento T5 para *C. vulgaris*, siendo la densidad para el sexto día de $0,68 \times 10^6$ células/ml, para *Scenedesmus sp* tal como se puede observar en la figura 10.

Figura 10

Promedio ± error estándar de la media de la densidad celular de las dos especies



Nota. Promedio ± error estándar de la media de la densidad celular (cel/ml × 10⁶) a través del tiempo hasta los 10 días del ensayo para las microalgas (a.) *Scenedesmus sp.* y (b.) *Chlorella vulgaris* en cinco concentraciones de nitrógeno en medio F/2 Guillard.

El análisis de varianza ANOVA mostró que las concentraciones de nitrato registraron diferencias significativas en la densidad celular, clorofila *a* y % de lípidos ($p < 0,05$) afectando el crecimiento celular de las dos especies, especialmente de *Scenedesmus sp.* Los análisis muestran una relación condicionada entre el nitrato y el crecimiento algal, aumentando la densidad algal en los tratamientos que contenían mayor cantidad de nitratos. Para los que contenían menor cantidad de nitratos (T5 = 1,5g) su crecimiento algal fue relativamente bajo en la especie de *C. vulgaris*. En la tabla 5 se observa el análisis de varianza de dos factores, relacionando dos variables (concentración de nitrato vs especie), lo cual está altamente relacionado con la densidad celular, clorofila *a* y % de lípidos.

Por otro lado, las dos especies de microalgas evaluadas mostraron mayores tasas de crecimiento cuando fueron cultivadas en concentraciones medias de nitratos (T3, T4 y T1) correspondiendo a los valores más altos en *C. vulgaris*.

Tabla 4 Densidad celular y clorofila a

Factores	% Lípidos	Densidad celular	Clorofila -a
Factor 1: Especie	p<0,0001**	p=0,0003*	p=0,0051*
Factor 2: Concentraciones Nitrógeno	p<0,0001**	p=0,1927	p=0,8175
Factor 1 x Factor 2	p= 0,1909	p=0,5442	p=0,9544

** Altamente Significativo p<0,001

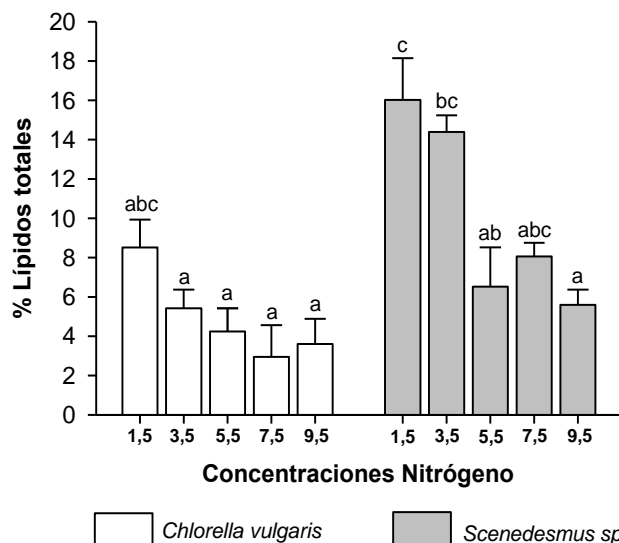
* Significativo; p<0,05

Nota. Análisis de varianza de dos factores (especie x concentración Nitratos) para las variables evaluadas como % lípidos, Densidad celular y clorofila-a al final del ensayo (día 10).

Al usar diferentes concentraciones de nitrato en los medios de cultivos se pudo observar que el porcentaje de lípidos variaba de acuerdo a su concentración, lo cual tuvo una significancia alta (p<0.005) acumulándose mayor cantidad lipídico en las microalgas que tenían menor cantidad de nitrógeno para las dos especies, tal como se observa en la figura 11. Donde se puede apreciar que en las dos especies, el porcentaje de lípidos tuvo una relación inversa, es decir, a mayor cantidad de nitrógeno menor acumulación de lípidos y viceversa.

Figura 11

Promedio \pm error estándar de la media del % de lípidos totales para las dos especies.



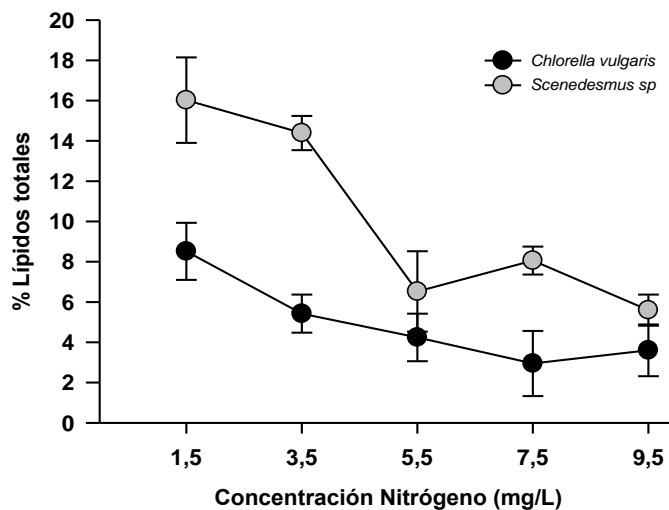
Nota. Promedio \pm error estándar de la media del % de lípidos totales para las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* en cinco (5) diferentes concentraciones de nitratos en el medio F/2 Guillard. Letras diferentes indican entre los tratamientos diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0.05$).

La especie que mayor cantidad de lípidos acumuló fue *Scenedesmus sp*. debido a la cantidad de biomasa seca que se extrajo en el experimento, usando 0,4 g aproximadamente de biomasa seca para cada réplica de cada tratamiento. Para *C. vulgaris* el promedio de peso de biomasa seca usado para la extracción de lípidos fue de aproximadamente 0,11g. El T5 fue el que mayor obtuvo una acumulación de lípidos en las dos especies siendo para *Scenedesmus sp*. un porcentaje de 16,02% y para *C. vulgaris* un porcentaje de 8,51%. El tratamiento 1 (9,5g) para *Scenedesmus sp* y el tratamiento 2 (7,5g) para *Chlorella vulgaris* fueron los procedimientos que tuvieron menor contenido lipídico. Además, el tratamiento 5 (1,5g) para las dos especies de acuerdo a la prueba de Tukey (ver figura 11) confirma que hay diferencia significativa, observando que no se repite ninguna letra para la especie de *Scenedesmus sp* con respecto a los demás tratamientos y para la especie de *C. vulgaris* solo se repite la letra (a), lo que nos da a

entender que efectivamente sí influye la concentración de nitratos en la producción de lípidos en estos organismos.

Figura 12

Promedio \pm error estándar de la media del % de lípidos totales en las dos especies.



Nota. Promedio \pm error estándar de la media del % de lípidos totales que muestran el comportamiento a los diez (10) días para las especies *Scenedesmus sp* y *Chlorella vulgaris* en las cinco (5) concentraciones de nitrógeno.

Figura 13

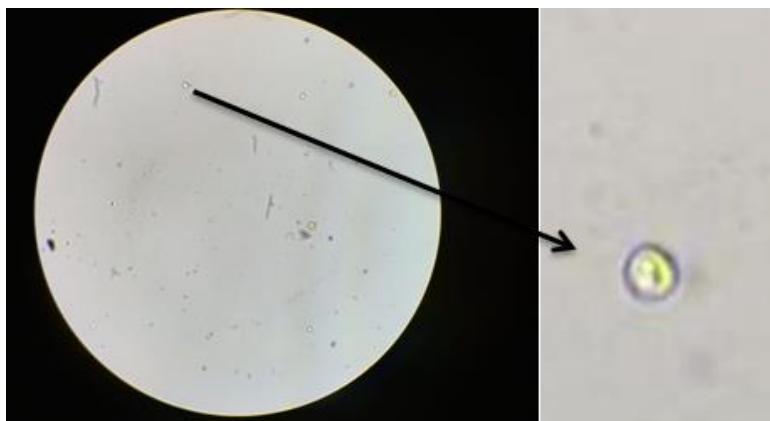
Lípidos de la especie *C. vulgaris*.



Nota. Grasa extraída de la biomasa seca del T4 (3,5g) de la especie *Chlorella vulgaris* con el método Soxhlet.

Figura 14

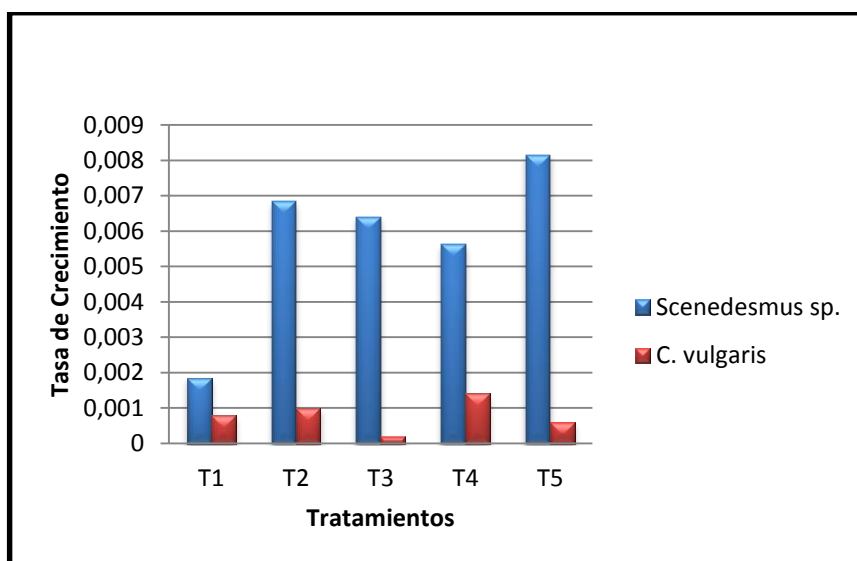
Célula de C. vulgaris con alto contenido lipídico



Nota. célula de (*C. vulgaris*) del T5 (1,5g) acumulando mayor cantidad de lípidos, aumentando su tamaño en comparación con una célula en condiciones normales en el medio de cultivo.

Tasa de Crecimiento**Figura 15**

Tasa de Crecimiento de las dos especies

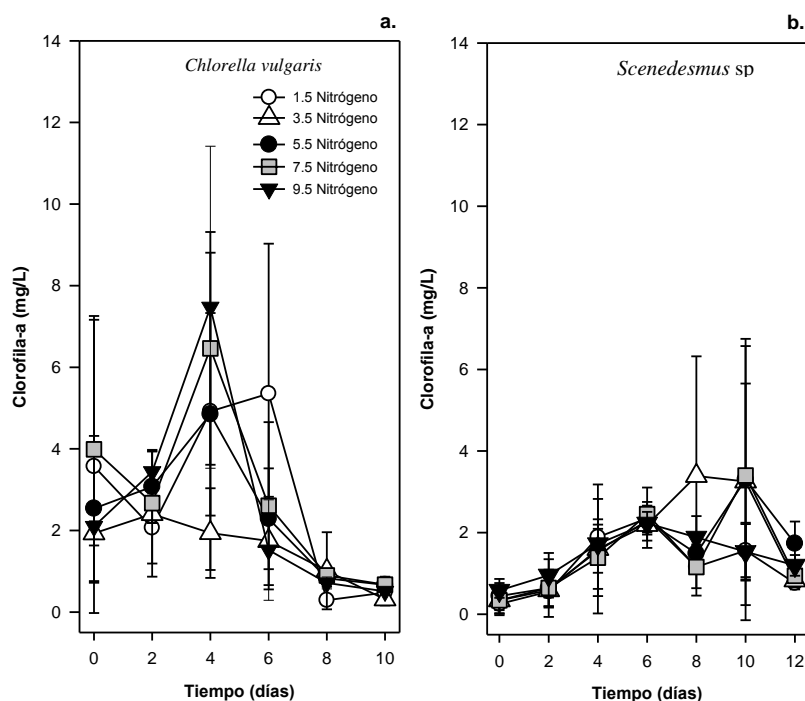


Nota. Promedio de la tasa de crecimiento Vs tratamientos usados en el experimento visualizando el comportamiento cuando la concentración de nitratos varía.

En la figura 15 se observa que la tasa de crecimiento varió con respecto a la concentración de nitrógeno, siendo el T5 (1,5g) el que obtuvo una mayor tasa de crecimiento, con promedio de $(0,0082 \text{ d}^{-1})$ para *Scenedesmus* sp. También, puede evidenciar que la especie de *C. vulgaris* en el T4 (3,5g) presentó la tasa de crecimiento más elevada $(0,0014 \text{ d}^{-1})$ con respecto a los demás tratamientos. Por otro lado, el T1 (9,5g) y T3 (5,5g) se obtuvo la menor tasa de crecimiento para *Scenedesmus* sp y *Chorella vulgaris* respectivamente, siendo para la primera especie, una tasa de crecimiento promedio de $(0,0018 \text{ d}^{-1})$ y para la segunda especie de $(0,0002 \text{ d}^{-1})$.

Figura 16

Clorofila a en las dos especies



Nota: Promedio \pm error estándar de la media de la *Clorofila-a* a través del tiempo hasta los 10 día del ensayo para las microalgas (a.) *Chlorella vulgaris* y (b.) *Scenedesmus* sp. en cinco concentraciones de nitrógeno en medio F/2 Guillard.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las microalgas son organismos fotosintéticos que pueden ser autótrofas o heterótrofas, estas microalgas al ser sometidas a limitaciones de nutrientes provoca el acumulamiento de la biomasa y contenido lipídico en su estructura celular. Las microalgas contienen ácidos grasos como componente en su membrana, lo cual normalmente se encuentran en los productos de almacenamiento, metabolitos y fuentes de energía. Algunas especies de microalgas pueden llegar a acumular el 20-80% (peso seco) de triglicéridos para la producción de biodiesel (Fernández-Linares et al, 2012). Según Tejada-Benítez, Henao-Argumedo, Alvear-Alayón y Castillo Saldarriaga (2015), “las mejores microalgas para la producción de biodiesel son las que tienen un diámetro menor a 2 mm, ya que producen más aceite y crecen de forma más rápida.” *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.* son especies que acumulan gran cantidad de triglicéridos ya que tienen un alto contenido lipídico en comparación con otras especies, alcanzado para *C. vulgaris*, porcentajes de 5% a 58 % de contenido lipídico (peso seco) y *Scenedesmus* alcanzando un contenido lipídico entre 19,6% y 21,1% según Mata et al (2010). Además, *C. vulgaris* tiene un crecimiento relativamente alto cuando se compara con otras especies, crece fácilmente en medios siempre y cuando tenga micro y macronutrientes esenciales para su desarrollo, también el tamaño de la microalga oscila de 2 a 10 μm (Rodríguez et al, 2014). *Scenedesmus sp* tiene un tamaño de 12-14 μm de ancho y 15-20 μm de largo, crecen fácilmente, tiene una velocidad de crecimiento relativamente alta y con una buena acumulación de contenido lipídico (Rodríguez et al, 2014).

Densidad celular y Tasa de crecimiento:

La tasa de crecimiento de *Scenedesmus sp* fue más alta que la de *C. vulgaris* lo cual, es evidente que la primera especie tolera las altas concentraciones de nitratos en comparación de la segunda. El nitrógeno es un macronutriente inorgánico importante para el crecimiento de las microalgas, además es aceptado en las vías metabólicas de éstas, pero en altas concentraciones también puede inhibir el crecimiento algal como sucedió como *C. vulgaris*. Por otra parte, las microalgas utilizan preferiblemente el amonio cuando este se encuentra disponible en su medio como principal fuente de nitrógeno lo cual, para el uso de nitrato las microalgas deben realizar la transformación de nitrato a nitrito y luego a amonio mediante cuatro pasos de reducción, para poder ser consumido. Así, esta reducción requiere de altos contenidos de energía para las microalgas (González, 2010). Por esta razón, al agregarle grandes concentraciones de nitrato al medio, la microalga no reducía completamente el nitrato y por lo tanto no tenían suficiente energía para realizar la reducción y al tener una deficiencia de macronutriente, la tasa de crecimiento se redujo. Resultados diferentes fueron encontrados por Gonzalez, 2010, en la cual, el efecto de deficiencia de nitrógeno en *Chlorella vulgaris* reveló que esta especie es susceptible a la deficiencia de nitrógeno ya que, al disminuir la concentración, también disminuyó la tasa de crecimiento.

Chlorella vulgaris es una especie de microalga que contiene una alta velocidad de crecimiento y además responde satisfactoriamente a diversas alteraciones ambientales, cambiando sus rutas metabólicas para poder adaptarse y sobrevivir al medio. Estas condiciones que afectan el ciclo de vida de las microalgas tales como la composición del medio, la temperatura, iluminación y tasa de aireación afecta el perfil de ácidos grasos y contenido lipídico aumentando o disminuyendo su porcentaje. Según Tejada- Benítez et al (2015) las microalgas

generalmente responden a la ausencia de nutrientes mediante la intensificación de la vía metabólica de la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), lo cual, cada especie puede llegar a tener una buena productividad, pero bajo perfil lipídico o puede ser de la manera contraria.

Así, la relación entre el porcentaje lipídico y la variación de concentración de nitratos es altamente significativa debido a que cuando la microalga fue expuesta a concentraciones altas de nitratos, su densidad algal fue relativamente alta pero la producción de lípidos fue muy baja, tal como se pudo observar en los resultados de este experimento (figura 12) y lo contrario sucedió cuando la microalga fueron expuestas a bajas concentraciones de nitratos, su densidad algal fue baja pero se extrajo un alto contenido lipídico ya que las microalgas modifican las vías metabólicas formando triglicéridos en el retículo endoplasmático especialmente en los plástidos que es donde se producen los lípidos neutros con la finalidad de poder almacenar energía y liberar espacio dentro de la célula permitiéndole a la microalga soportar las condiciones adversas (Rodríguez et al, 2012). Es importante resaltar que, en las dos especies de microalgas, la producción de lípidos totales incrementó cuando la microalga se encontraba en bajas concentraciones de nitratos, pero el crecimiento algal disminuyó.

Clorofila *a*:

Según (Castro, 2021) la reducción de clorofila *a* se puede observar cuando se agotan los nutrientes especialmente el nitrógeno y el fósforo en un medio de cultivo, lo cual, se pudo evidenciar que en los tratamientos que tenían menor concentración de nitrato como el T4 (3,5) y T5 (1,5) obtuvo la menor concentración de clorofila *a* con respecto a las que tuvieron mayor concentración de nitrato en las dos especies. El caso contrario sucedió el día 6 para *Chlorella vulgaris* con el tratamiento 5 (1,5) y el día 8 para *Scenedesmus* sp con el tratamiento (4) donde

obtuvieron una alta concentración de clorofila *a*, dando a conocer que hubo error humano y por ende hubo una mala calibración del espectrómetro alterando los resultados. tal como se muestra en la figura 16. Al comparar la figura 10 con respecto a la densidad algal y la figura 16 que corresponde a la clorofila *a* se pudo observar que la especie *Chlorella vulgaris* tuvo una mejor concentración de clorofila en todos los tratamientos a diferencia de *Scenedesmus* sp teniendo una relación directa con la densidad algal. Además, según la ley de Lambert-Beer, la absorbancia está relacionada con la concentración de las sustancias (*c*) donde *c*, expresa las unidades de mol/L (*M*) *b*, la longitud de onda y ϵ es la absorptividad molar, lo cual, la Ley de Lambert-Beer se resume con la siguiente ecuación: $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ (Higson, 2007).

Por ende, a mayor densidad algal, mayor será la concentración de clorofila y viceversa. Tal como se pudo observar en las dos figuras 10 y 16 respectivamente.

Contenido lipídico:

Según Maldonado (2011), establece que las limitaciones de nitrógeno es una estrategia muy eficiente para incrementar el contenido lípido en microalgas, especialmente los triglicéridos ya que son éstos los que se acumulan en la membrana celular y cloroplastos por la deficiencia de condiciones físicos y químicos en el medio. La manera como la microalga se adapte a medios con condiciones desfavorables para su crecimiento, permite que la microalga se manifieste con respuestas específicas y generales debido al factor limitante, permitiendo algunos cambios morfológicos como el aumento de la célula (figura 17), cese de la división celular, alteraciones en la permeabilidad de las membranas, acumulación de lípidos o carbohidratos, reducción de la actividad fotosintética y modificaciones en los procesos metabólicos.

Cuando la microalga se encuentra en un medio con deficiencia en concentración de nitrógeno para la síntesis de proteínas requerida para el crecimiento, el exceso de carbono

producto de la fotosíntesis se canaliza en moléculas de almacenamiento como triglicéridos o almidón (Amaro et al, 2011). Tal como se observó en esta investigación, el contenido lipídico varió con respecto a la concentración de nitrógeno, extrayendo mayor cantidad de lípidos neutros en tratamientos con bajas concentraciones de nitratos en las dos especies. La especie *Scenedesmus sp.* fue la que tuvo mayor porcentaje de lípidos totales en comparación a *Chlorella vulgaris* debido a que se pudo extraer mayor cantidad de biomasa húmeda en la primera especie ya que el método de separación que se usó fue la decantación y por ende, al ser una microalga con mayor tamaño en comparación con *Chlorella vulgaris*, la presencia de la gravedad, hace que se precipiten y por ende permite una mejor separación, lo que no sucedió con *Chlorella vulgaris* ya que es una microalga de menor tamaño y por esta razón el tiempo de decantación no fue suficiente y se desperdició mayor cantidad de biomasa húmeda cuando fue puesta en la centrifugadora. En diferentes estudios, *Chlorella vulgaris* produce mayor cantidad de lípidos totales que en comparación a *Scenedesmus sp.* pero en otras investigaciones como la de Cobos Ruíz, et al (2015) *Scenedesmus sp* obtuvo también una mayor cantidad de lípidos neutros en comparación a *Chlorella vulgaris* cuando el medio de cultivo se encontraba en bajas concentraciones de nitratos o sin nitratos. Por otro lado, Gonzales y Magallanes (2012) indicaron que *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* tuvieron un alto potencial de producción de lípidos siendo *Chlorella sp.* la más alta con un máximo de 37% en comparación con la segunda especie que obtuvo 18% en los tratamientos que no tuvieron nitrógeno.

CONCLUSIONES

La extracción de lípidos de las dos especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp*, sometidas a diferentes concentraciones de nitratos reveló que las microalgas al ser sometidas a estrés nutritivo, obliga a éstas a cambiar las rutas metabólicas y por ende acumulan grandes cantidades de ácidos grasos como fuente de energía. Por tal motivo, la relación entre nitratos y lípidos es altamente significativa, a mayor concentración de nitrógeno, menor concentración de lípidos y viceversa.

Se determinó que *Scenedesmus sp* obtuvo mayor cantidad de porcentaje de lípidos totales cuando se comparó con *Chlorella vulgaris* siendo para la primera especie 16,02% y para la segunda especie 8,51%, simultáneamente. Lo cual es evidente que *Scenedesmus sp* genera mayor biomasa húmeda que *C. vulgaris*.

La tasa de crecimiento de *Chlorella vulgaris* no es susceptible a la variación de concentración de nitratos ya que, al tener una mayor cantidad de nitrato en su medio, este presentó una deficiencia en su tasa de crecimiento, indicando que esta cepa no tolera las grandes cantidades de nitratos en su medio de cultivo. A diferencia de *Scenedesmus sp* que sí presentó susceptibilidad a las variaciones de nitratos en su medio, lo cual es altamente tolerante al nitrato.

El contenido de clorofila *a* en las dos especies demuestra que la densidad algal está relacionada con la concentración de clorofila *a* ya que al observar las gráficas 10 y 16 se pudo obtener una variación entre las dos especies, siendo *Chlorella vulgaris* la especie con mejor crecimiento en variaciones de nitratos y mejor concentración de clorofila *a* en todos los tratamientos. También se pudo evidenciar errores humanos en la calibración del espectrómetro usado, alterando algunos resultados en la concentración de clorofila *a*.

Las diferentes especies trabajadas en este proyecto (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp) demostró una alta significancia ($p > 0,001$) con respecto al % lipídico, lo cual, la acumulación de lípidos es diferente en cada especie. Siendo para este trabajo *Scenedesmus* sp la que mayor acumulación tuvo con respecto a la segunda especie. De igual forma sucedió con la concentración de nitratos usados en los tratamientos, confirmando la hipótesis alternativa que, a menor concentración de nitratos, mayor será la acumulación de lípidos en las dos especies.

RECOMENDACIONES

La siguiente investigación se realizó con el propósito de observar el potencial de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp en la producción de lípidos, que eventualmente puedan ser convertidos a biodiesel y para que futuras investigaciones se lleve a cabo las diferentes metodologías para su extracción, logrando así, un biodiesel de excelente calidad, rentable, económico y que contribuya a la recuperación del medio ambiente. Además, tener la posibilidad de competir con los combustibles fósiles.

REFERENCIAS

- Amaro, H.M., Guedes, A.C., Malcata, F.X., (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*. Article in press.
- Araujo J. y Vargas S. (2017). Evaluación del efecto de tres concentraciones de microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la densidad poblacional del cladóceros: *Ceriodaphnia* sp. en condiciones de laboratorio. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Iquitos-Perú.
- Ardila A., López Y., Vásquez M., Gonzales A., Barajas A. (2016). Obtención de lípidos y carbohidratos a partir de microalgas mediante el diseño de medios de cultivos selectivos. *Tecnológicas*. Vol 20.
- Astocondor M., Huatuco E., Terreros H., y Delgado R. (2017). Crecimiento poblacional -y productividad de la microalga nativa *Chlorella* peruviana bajo diferentes salinidades. Universidad Nacional de San Marcos, Lima, Perú.
- Barsanti L., Gualtieri P. (2006). *Algae Anatomy Biochemistry and Biotechnology*. Taylor and Francis group, LLC. USA.
- Bellinger W., Sigeo D. (2010). *Freshwater Algae. Identification and use as bioindicators*. Edit. Wiley- Blackwell, USA.
- Bojorge-García M., y Cantora-Uriza E. (2016). La Importancia Ecológica de las Algas en los Ríos. *Hidrobiológica*, Vol.26. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cando S. (2015). Perfil lipídico de microalgas antárticas recolectadas en febrero 2013 en el Archipiélago Schetland del Sur. Universidad Central del Ecuador.

- Castillo O., Torres-Bardajoz S., Nuñez-Colín C., Peña-Caballero V., Herrera C. (2017).
Producción de Biodiesel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológica.
Universidad de Guanajuato. *Hidrobiológica*. 27 (3)337-352.
- Castro J. (2021). Efecto de reguladores de crecimiento en la producción de lípidos, proteína total soluble, clorofila y carotenoides totales en cultivos de *Scenedesmus acutus* UTEX-72 y *Chlorella vulgaris* OW-0. Tesis de grado. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
Recuperado de:
<http://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/bitstream/handle/i/7192/TesisM.FCQ.2021.Efecto.Castro%28Versi%c3%b3n%20p%c3%bablica%29.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Cerón M. (2013). Producción de Microalgas con Aplicaciones Nutricionales para Humanos y Animales. Cuadernos de estudios Agroalimentarios. ISSN 2173-7568. Universidad de Almería.
- Chacón-Lee T. y Gonzáles-Mariño G. (2010). Microalgae for Healthy Foods-Possibilities and Challenges Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9 (6) 655-675.
- Cobos Ruiz M., Paredes Rodríguez J. y Castro Gómez J.C. (2015). Inducción de la producción de lípidos totales en microalgas sometidas a estrés nutritivos. Universidad Nacional de Colombia. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v21n1.47439>
- Diario del Huila. (2011). En Pitalito aprendices del Sena producen biodiesel con aceite de cocina reciclado.
- Fuentes K. y Olivera J.A. (2017). Evaluación de Diferentes Procesos de Tratamiento de Aguapara La Obtención de Subproductos Utilizando Microalgas. Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá.

- García J. (2011). Comparación de Métodos de Extracción de Aceite de Microalgas a Escala Laboratorio para la Producción de Biodiesel.
- Gobernación del Huila. (2008). Asistencia técnica para la identificación y formulación de una alternativa económica sostenible y sustentable para el norte del departamento y su incorporación y contribución a la consolidación de la apuesta agroindustrial de la agenda interna para la productividad y competitividad del Huila. Incubarhuila.
- González A., Galindo L., González S., Peralta Y. y Kafarov V. (2011). Adaptación del Método Bligh y Dyer para la Extracción de Lípidos de Microalgas Colombianas para la Producción de biodiesel de Tercera Generación. Universidad Nacional Abierta y a Distancia- UNAD. Revista Especializada de Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomaterial.
- Gonzales A, Magallanes J. (2012). Efecto del estrés nutritivo sobre la producción de lípidos en tres cepas de microalgas clorófitas. México D.F.: 1er Encuentro de Jóvenes Investigadores-CONACYT; p- 23-25
- Gómez M. (2016). Extracción asistida con microondas de aceite esencial de acuyo (*Piper auritum*) y evaluación de su efecto antifúngico contra *Penicillium expansum*. Investigación y desarrollo en ciencia y tecnología de alimentos, 173-178.
- Gonzales A. (2016). Experimental adjustment and economic evaluation of hbe microalgae oil extraction for biofuels and bioproducts. Prospect, 45-52.
- Gonzales M. (2006). Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. Universidad Autónoma Metropolitana.

- Gonzales L. (2010). Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. Universidad Nacional de Colombia.
- Guamán M., Gonzáles N. (2016), Catálogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador. Corporación para la investigación energética. Laboratorio de Biotecnología energética. Quito, Ecuador.
- Higson, S. P. J. (2007). Química Analítica. 1ª ed. Capítulo 5. Ed. Mc Graw Hill.
- Jimenez JD. (2017). Estudio de la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* crecida heterotróficamente sobre vinazas de la caña de azúcar. Universidad Icesi. Valle del Cauca.
- León M. (2015). Respuesta de Lechuga (*Lactuca sativa L. var. crispata*) y Remolacha (*Beta vulgaris L. var. conditiva*) A la aplicación al suelo del consorcio de microalgas (*Chlorella* sp.) y (*Scenedesmus* sp). Tesis de grado publicado. Universidad Central del Ecuador. Recuperado de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6757/1/T-UCE-0004-21.pdf>
- Lombana J., Vega J., Britton E. y Herrera S. (2015). Análisis del sector biodiesel en Colombia y su cadena de suministro. Universidad del Norte. Barranquilla, Colombia.
- Maldonado C. (2011). Inducción lipídica por limitación de nutrientes en las microalgas *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella sorokiniana*. Centro de Investigaciones en Materiales Avanzados.
- Monteza S. y Samane J. (2016). Extracción, caracterización y determinación del tiempo de vida útil del aceite de semilla de zapote (*Matisia cordata*). Universidad Señor de Sipán.

- Ochoa A., Galindo J. y Juárez D. (2020). Diversidad Fitoplanctónica de Embalses Continentales del Valle del Yaqui. Universidad de Juárez Autónoma de Tabasco. Recuperado de: [file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/3338-Texto%20del%20art%C3%ADculo-22557-1-10-20201217%20\(4\).pdf](file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/3338-Texto%20del%20art%C3%ADculo-22557-1-10-20201217%20(4).pdf)
- Otero A. (2010). Evaluación de Impacto Ecotoxicológico de Efluentes de una Explotación Petrolera y Fenantreno, Usando Especies de Invertebrados. Universidad de los Llanos. Villavicencio.
- Pastor V. y Pozo A. (2013). Evaluación del rol de la iluminación, el pH y la cantidad de nutrientes en el crecimiento de la microalga *Scenedesmus sp* en condiciones de laboratorio. Universidad Politécnica Salesiana, Sede Quito.
- Pérez MJ. Y Quishpi J. (2014). Evaluación cuantitativa de la producción de biodiesel de microalgas de lagunas de tratamiento de agua residual. Universidad de Cuenca. Cuenca-Ecuador.
- Pérez A. y Labbé J. (2014). Microalgas, cultivos y beneficios. Revista de Biología Marina. Vol 49 N°2: 157-173. Chile.
- Rachid N., Rehman M., Sadiq M., Mahmood T., y Han J. (2014). Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews 40: 760-778. DOI: 10.1016/j.ser.2014.07.104.
- Robles-Heredia J., Sacramento Rivero J., Candelo-López Y., Ruiz-Marín A. y Vilchiz-Bravo E. (2015). A multistage gradual nitrogen-reduction strategy for increased lipid productivity and nitrogen removal in wastewater using *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*. Brazilian Journal of Chemical Engineering.

- Salazar L. (2012). Evaluación de Métodos de Extracción de Aceites de Microalgas para la Producción de Biodiesel. Facultad de Ingeniería y de Sistemas. Universidad de Piura.
- Sánchez-Guillén N. (2020). Nutrición de las algas (autótrofas y heterótrofas). Pigmentos y cloroplastos. AlimentaciónDe. Recuperado de: <https://alimentacionde.com/otros-organismos/nutricion-de-las-algas-autotrofas-y-heterotrofas/>
- Serrano L. (2012). Estudio de Cuatro Cepas Nativas de Microalgas para Evaluar su Potencial uso en la Producción de biodiesel. Universidad Nacional de Colombia.
- Sigee D. (2005). Freshwater Microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganism in the aquatic environment. University of Manchester.
- Sipaúba-Tavares L. y Rocha O. (2001). Produção de plâncton (Fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. São Carlos, RiMa editora. 106 p.
- Sipaúba-Tavares L. y Rocha O. (2003). Produção de plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. SãoCarlos: RIMA, 106 p.
- Soledad S. y Rubio J. (2018). Evaluación de biomasa de microalgas de la laguna Limoncocha como materia prima para la obtención de biocombustible. Universidad Internacional SEK. Quito, Ecuador.
- Trinidad M., Martínez A. y Cañizares R. (2013). Producción de Biodiesel a Partir de Microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. México.
- Werlinger C., Alveal K.y Romo H. (2004). Biología marina y oceanografía: Conceptos y procesos. Concepción: Gobierno de Chile, Consejo Nacional del Libro y la Lectura.

