

**INFLUENCIA DEL GLICEROL RESIDUAL Y ACETATO DE SODIO EN LA
PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ACUMULACIÓN LIPÍDICA DE *Chlorella*
vulgaris CULTIVADA CON DIFERENTES RELACIONES
CARBONO/NITRÓGENO**

LAURA LUCÍA ESTÉVEZ LANDAZÁBAL

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2013

**INFLUENCIA DEL GLICEROL RESIDUAL Y ACETATO DE SODIO EN LA
PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ACUMULACIÓN LIPÍDICA DE *Chlorella*
vulgaris CULTIVADA CON DIFERENTES RELACIONES
CARBONO/NITRÓGENO**

LAURA LUCÍA ESTÉVEZ LANDAZÁBAL

**Trabajo de Grado presentado como requisito
para optar el título de Bióloga**

Director:

Ph. D. Viatcheslav Kafarov

Codirector:

Biólogo Andrés Fernando Barajas Solano

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2013

*A mis padres y a Dios,
Sin ellos nada hubiera sido posible.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por todos los sacrificios que han realizado, sé que las palabras de agradecimiento no les harían justicia, por eso les dedico esta tesis.

A mis hermanos, por iluminar mi vida con su alegría.

A mi familia, por su cariño y respaldo en todos mis objetivos, en especial a Martha Estévez y Sergio Suarez, quienes me ayudaron incondicionalmente.

A Diego, por su paciencia inquebrantable y su apoyo constante.

A Orlando, Carlos, Maria, Lilu, Mayo, Erika, Andres, Mauricio, Alvaro, Juan moises, por su compañía, especialmente en días de crisis; por multiplicar los buenos momentos y ayudarme a superar las dificultades.

A mis maestros, por todas las enseñanzas dadas a lo largo de la carrera.

A mis directores, por brindarme la oportunidad de trabajar con ellos y descubrir nuevas perspectivas.

A todos los que de una u otra forma aportaron en el desarrollo de este trabajo, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. MARCO TEÓRICO	
1.1 GENERALIDADES EN <i>Chlorella vulgaris</i>	16
1.2. MIXOTROFÍA EN <i>C. vulgaris</i>	16
1.2.1. Glicerol residual y acetato como fuentes de carbono orgánico	16
1.3. INTEGRACIÓN DEL METABOLISMO DEL CARBONO Y EL NITRÓGENO	18
1.4. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1. INÓCULO	21
2.2. RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO	21
2.3. PESO SECO	23
2.4. CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA	23
2.5. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS	23
2.6. PORCENTAJE LIPÍDICO	24
2.7. PRODUCTIVIDAD LIPÍDICA VOLUMÉTRICA	24
2.8. CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO Y FÓSFORO EN EL MEDIO	24
2.9. MEDICIÓN DE PH	26
2.10. ANÁLISIS DE DATOS	26
3. RESULTADOS	27
4. DISCUSIÓN	37

5. CONCLUSIONES

42

6. BIBLIOGRAFÍA

43

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Concentraciones de biomasa finales de las diferentes fuentes de carbono orgánico.	28
Figura 2. Concentraciones de biomasa finales de los tratamientos con acetato de sodio.	29
Figura 3. Concentración de biomasa en las interacciones acetato de sodio-nitrato.	30
Figura 4. Concentraciones de biomasa finales resultantes de los tratamientos con glicerol.	31
Figura 5. Concentración de biomasa en las interacciones glicerol-nitrato y el control.	32
Figura 6. Porcentajes lipídicos observados y esperados en el control y los tratamientos con 1,47mM de NaNO ₃ y acetato.	32
Figura 7. Productividades lipídicas en el control y tratamientos a los cuales se adicionó acetato de sodio.	35
Figura 8. Productividades lipídicas en el control y tratamientos a los cuales se adicionó glicerol residual.	36

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Diseño experimental para los cultivos con acetato de sodio.	22
Tabla 2. Diseño experimental para los cultivos con glicerol residual.	22
Tabla 3. Variables e interacciones entre variables estadísticamente significativas en la concentración de biomasa.	27
Tabla 4. Tabla de resultados de X^2 para productividad lipídica.	32

RESUMEN

TÍTULO: INFLUENCIA DEL GLICEROL RESIDUAL Y ACETATO DE SODIO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ACUMULACIÓN LIPÍDICA DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA CON DIFERENTES RELACIONES CARBONO/NITRÓGENO*

AUTOR: Laura Lucía Estévez Landazábal**

PALABRAS CLAVE: acetato, glicerol residual, cultivo mixotrófico, *Chlorella vulgaris*.

Las microalgas poseen gran potencial como materia prima para la producción de biodiesel, pero es necesario aumentar tanto la productividad de biomasa como de lípidos. Una forma para lograr este objetivo es la implementación de cultivos mixotróficos y la regulación de la relación carbono/nitrógeno. El presente trabajo tiene como objetivo aumentar la concentración de biomasa y lípidos en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 usando como fuentes de carbono glicerol residual de la producción de biodiesel y acetato de sodio junto con modificación de la concentración de nitrógeno inicial. Todos los tratamientos fueron realizados a $23 \pm 1^\circ\text{C}$, con ciclos luz-oscuridad 12h: 12h durante periodos establecidos de 5 días. *Chlorella vulgaris* presentó incrementos significativos en el crecimiento y la producción de lípidos al suplementar en el medio de cultivo acetato de sodio ó glicerol residual. Dicho incremento estuvo influenciado por la concentración de nitrato. Las diferentes interacciones entre carbono y nitrógeno posiblemente afectaron rutas de síntesis de biocompuestos de almacenamiento como almidón y lípidos, y proteínas con funciones específicas como las enzimas. Se concluye que el cultivo mixotrófico de *C. vulgaris* empleando el glicerol, que es un residuo de la producción de biodiesel, ó el acetato de sodio un compuesto económico que puede derivarse de la producción de biohidrógeno, es un enfoque viable para la producción de biomasa destinada a la fabricación de biocombustibles debido al incremento significativo en la productividad lipídica sin emplear compuestos costosos y sin comprometer recursos alimenticios como la glucosa.

*Proyecto de grado.

**Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Director: Viatcheslav Kafarov, Ph. D. & Codirector: Andrés Fernando Barajas, Biólogo.

ABSTRACT

TITLE: INFLUENCE OF RESIDUAL GLYCEROL AND SODIUM ACETATE ON BIOMASS PRODUCTION AND LIPIDIC ACUMULATION OF *Chlorella vulgaris* CULTURED WITH DIFERENT CARBON/NITROGEN RATIOS*

AUTHOR: Laura Lucía Estévez Landazábal**

KEYWORDS: acetate, residual glycerol, mixotrophic culture, *Chlorella vulgaris*.

Microalgae have great potential as feedstock for biodiesel production, but is necessary increase the lipidic and biomass productivity. One way to achieve this goal is the implementation of mixotrophic cultures and the regulation of carbon/nitrogen ratios. This work aims to increase the biomass concentration and lipid in *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 using residual glycerol and sodium acetate as carbon sources and modifying the initial nitrogen concentration. All treatments were performed at $23 \pm 1^\circ\text{C}$, with light-dark cycles 12h:12h at set periods of 5 days. *Chlorella vulgaris* showed significant increases in the growth and lipid production supplementing sodium acetate or residual glycerol in the culture medium. This increase was influenced by the concentration of nitrate. The different interactions between carbon and nitrogen fixation may affect the storage of biomolecules like starch and lipids, and synthesis routes of proteins with especific functions like enzymes. In conclusion the mixotrophic culture of *C. vulgaris* using glycerol, wich is a residue of the production of biodiesel, or sodium acetate, wich can be derived of the production of biohydrogen is a viable approach for the biomass production for the manufacture of biofuels due to the significant increase in lipidic productivity without employing costly compounds nor compromising food resources such as glucose.

*Thesis project.

**Universidad Industrial de Santander, Science Faculty, Biology School. Tutor: Viatcheslav Kafarov, Ph. D. & Co-tutor: Andrés Fernando Barajas, Biologist.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los combustibles alternativos han adquirido gran importancia debido al rápido agotamiento de las reservas de petróleo y al deterioro de los ecosistemas (Ma & Hanna, 1999; Chisti, 2007; Song *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2008; Kalia & Purohit, 2008). Dentro de los organismos usados para la producción de biodiesel, las microalgas se destacan debido a que poseen una alta tasa de crecimiento, algunas especies poseen altos contenidos de aceite (los cuales pueden ser transesterificados), su producción no compite con la producción de alimentos ya que no requiere de grandes extensiones de cultivo y puede utilizar tierras no arables (Chisti, 2007; Williams, 2007; Song *et al.*, 2008). El biodiesel obtenido a partir de estos microorganismos es biodegradable, renovable, no contribuye a la liberación de sulfuro a la atmósfera y genera menos contaminantes gaseosos que los combustibles fósiles convencionales (Vicente *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2005); además, la quema de éstos últimos está asociada al calentamiento global (Gavrilescu & Chisti, 2005). Emplear los cultivos de microalgas destinados a la producción de biocompuestos en la biofijación de dióxido de carbono, tiene potencial no sólo para reducir los costos en la obtención de productos de valor agregado (biocombustibles, colorantes, proteínas, vitaminas) (Jeong *et al.*, 2003; Kanno & Kazie, 2005; Morais & Costa, 2007; Crutzen *et al.*, 2008), sino también la compensación de las emisiones de carbono (Beneman & Hughes, 1997; Heredia-Arroyo *et al.*, 2010).

Actualmente el método de cultivo más común es el autotrófico, en este, las células emplean la energía lumínica y usan el CO₂ como fuente de carbono (Pérez-García *et al.*, 2011). Aunque las microalgas pueden usar la luz eficientemente, el crecimiento en cultivos a gran escala es lento debido a la limitada penetración de la luz causada por el grosor de la columna de agua y las altas densidades celulares (Mandalam & Palsson, 1998; Yang *et al.*, 2000; Suh & Lee, 2003; Wen *et*

al., 2003). En vista de estas desventajas asociadas al cultivo autotrófico, una alternativa viable para algunas especies, es el uso de su capacidad de crecimiento heterotrófico, reemplazando la fijación de CO₂ con fuentes de carbono orgánico disueltos en el medio de cultivo. La heterotrofia se define como el uso de compuestos orgánicos para el crecimiento celular (Droop, 1974); una variante de este régimen de crecimiento es el mixotrófico, en el cual tanto CO₂ como la fuente de carbono orgánico son simultáneamente asimilados y los metabolismos fotosintético y respiratorio operan al mismo tiempo (Endo *et al.*, 1977; Kaplan *et al.*, 1986; Lee, 2004). Los cultivos mixotróficos emplean una fuente de carbono orgánico y producen más biomasa comparados con los cultivos autotróficos, dado que la tasa de crecimiento en condiciones mixotróficas es aproximadamente la suma de las tasas de crecimiento en cultivo autotrófico y heterotrófico (Endo *et al.*, 1977); sin embargo, para que el cultivo sea económicamente viable, se requiere una fuente de carbono de bajo costo y el conocimiento de cuáles concentraciones son las más favorables (Jeon *et al.*, 2006). Esto debido a que ciertas concentraciones pueden incrementar las tasas de crecimiento y obtención de biocompuestos (Martínez & Orus, 1991; Chisti, 2007, 2008; Liang *et al.*, 2009) mientras que otras resultan inhibitorias y tóxicas para las microalgas (Kobayashi *et al.*, 1993; Chen & Johns, 1994, 1996; Vazhappilly & Chen, 1998; Hagen *et al.*, 2001; Orosa *et al.*, 2001; Jeon *et al.*, 2006).

El costo de las fuentes de carbono orgánico (usualmente en forma de glucosa) es alto, comparado con todos los demás nutrientes agregados (Liang *et al.*, 2009); para superar esta dificultad debe establecerse una fuente económica, siendo el acetato y el glicerol residual buenos candidatos para tal fin (Liang *et al.*, 2009). El acetato es un sustrato de fácil acceso, derivado de muchas aplicaciones industriales (Pérez-García *et al.*, 2011), y es producto secundario de la obtención del biohidrógeno producido por microalgas (Heredia-Arroyo *et al.*, 2010). Por otra parte, el glicerol permanece como residuo después de que el biodiesel se produce (Pyle, 2008); sin embargo, el glicerol crudo producido es impuro y de poco valor

económico. Debido a que hay un exceso de glicerol impuro se deben investigar usos alternativos (Pyle, 2008), siendo su empleo como fuente de carbono orgánico para microalgas una idea atractiva.

En el presente estudio, se analizó la influencia del glicerol residual y del acetato de sodio en el aumento de biomasa, deposición de lípidos y productividad lipídica en *C. vulgaris* a escala de laboratorio con el fin de encontrarle uso a residuos orgánicos obtenidos en la producción de biodiesel y biohidrógeno, permitiendo un proceso de reciclaje en el que se genera biomasa destinada a producir biodiesel.

Se comparó la producción lipídica y la concentración de biomasa entre cultivos mixotróficos suplementados con glicerol ó acetato y cultivos autotróficos. También fueron evaluadas diferentes relaciones carbono/nitrógeno debido a que investigaciones anteriores sugieren efectos significativos en la composición lipídica y producción de biomasa.

Adicionalmente, se realizaron mediciones del nitrógeno y fósforo consumidos para poder establecer la relación existente entre la producción de biomasa, el almacenamiento de lípidos y la toma de estos nutrientes.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. GENERALIDADES DE *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris es una microalga de distribución mundial perteneciente al Phylum Chlorophyta, Clase Chlorophyceae Orden Chlorococcales, Familia Oocystaceae y género *Chlorella* (Kanno & Kazie, 2005). Tiene forma esférica, de 2 a 10 µm de diámetro, sin flagelo (Chen & Jiang, 2000). Contiene clorofilas tipo a y b en los cloroplastos (Van den Hoek, 1981). *C. vulgaris* es la fuente de chlorofila más rica disponible para el hombre (Bewicke & Potter, 1984). Posee comúnmente una concentración de chlorofila de 7% su peso seco total, aproximadamente diez veces más concentración que *Spirulina* (0,76%) (Bewicke & Potter, 1984). Se reproduce de forma asexual, cuando la célula alcanza su tamaño máximo, el núcleo se divide formando en el interior de la célula madre 4 u 8 células más pequeñas, liberadas por la ruptura de la pared celular de la madre (Des Abbayes *et al.*, 1989; Lee, 2008). Es capaz de dividirse en cuatro células cada 20 horas (Song *et al.*, 2008). Puede crecer de forma fotoautotrófica usando como fuente de carbono el CO₂, de forma heterotrófica en la cual la fuente de carbono es una sustancia orgánica (Richmond, 2004); ó mixotróficamente empleando ambas formas de crecimiento simultáneamente (Liang *et al.*, 2009).

1.2. MIXOTROFÍA EN *C. vulgaris*

La capacidad para asimilar compuestos orgánicos como fuente de carbono en presencia de luz, hace de *C. vulgaris* un organismo mixotrófico (Liang *et al.*, 2009); en condiciones mixotróficas, la fotosíntesis y la fosforilación oxidativa de las sustancias orgánicas de carbono parecen funcionar de manera independiente, ocasionando que la tasa de crecimiento en condiciones mixotróficas sea

aproximadamente igual a la suma de las contribuciones individuales de los cultivos fotoautótrofos y heterótrofos (Endo *et al.*, 1977; Ogawa & Aiba, 1981; Martínez & Orus, 1991; Márquez *et al.*, 1993).

En el crecimiento fotoautotrófico, las algas utilizan el CO₂ como su única fuente de carbono, dependen de la luz como única fuente de energía disponible para su crecimiento y mantenimiento; en el crecimiento heterotrófico los compuestos orgánicos (como la glucosa, acetato, etc.) son las únicas fuentes de energía, las células producen CO₂ y consumen O₂ (Buchanan *et al.*, 2000). El CO₂ originado heterotróficamente y el O₂ originado fotoautotróficamente son usados en la producción de biomasa (Chojnacka & Márquez, 2004).

Mediante el cultivo mixotrófico de *C. vulgaris* se integran algunas ventajas de las configuraciones fototróficas y heterotróficas (Yuan-Kun, 2001) al tiempo que se superan las dificultades asociadas a estas dos formas de cultivo (Yuan-Kun *et al.*, 1996). Las ventajas están relacionadas con incremento en la tasa crecimiento y productividad (Pringsheim & Wiessner, 1960; Syrett *et al.*, 1963; Martínez *et al.*, 1997) debido a una alta incorporación de carbono orgánico dentro de la célula, en particular en la formación de metabolitos como: lípidos, polisacáridos y proteínas (Nichols *et al.*, 1967; Harris & James, 1969). Esto es especialmente importante pues se han reportado aumentos de estas sustancias (al final de los experimentos de Syrett *et al.*, 1963) de hasta cinco veces el valor en las células autótrofas (Syrett *et al.*, 1963).

Otra ventaja del cultivo mixotrófico es la iluminación, que induce y regula la producción de macromoléculas de alto valor como pigmentos (Chen & Zhang, 1997; Lee, & Zhang, 1999) y ácidos grasos (Sukenik *et al.*, 1989; Sukenik, 1999; Cohen, 1999; Khotimchenko & Yakovleva, 2005), además disminuye la producción de dióxido de carbono en comparación con las células que metabolizan sustratos orgánicos en la oscuridad (cultivo heterotrófico) (Syrett *et al.*, 1963; Goulding & Merrett, 1966). Otro elemento a favor es que hay gran variedad de fuentes de

carbono disponibles para el empleo en cultivos mixotróficos, como lo son el acetato, glicerol, etanol, ácidos orgánicos, azúcares, almidón hidrolizado de yuca, hidrolizado de fécula de maíz y subproductos de procesos industriales como alpechín (Sánchez *et al.*, 2001).

1.2.1. Glicerol residual y acetato como fuentes de carbono orgánico

El glicerol es el subproducto de la reacción de transesterificación entre aceites o grasas y alcohol en la producción de biodiesel (Schenk *et al.*, 2008). El glicerol crudo obtenido es impuro y de poco valor económico (Pyle, 2008). Dada la saturación actual de glicerol crudo en el mercado, debido principalmente a la floreciente industria del biodiesel mundial, se han realizado diferentes estudios sobre usos alternativos (Pyle, 2008): se ha propuesto la combustión (Johnson & Taconi, 2007), el compostaje (Brown, 2007), alimentación animal (Cerrate *et al.*, 2006), conversiones termoquímicas (Dasari *et al.*, 2005; Alhanash *et al.*, 2008) y usarlo para incrementar la producción de biogás en procesos de digestión anaeróbica (Holm-Nielsen *et al.*, 2008).

Muy pocos estudios emplean el glicerol como fuente de carbono orgánico para el crecimiento de las microalgas (Chi *et al.*, 2007; Pyle *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2009; Heredia-Arroyo *et al.*, 2010) y están enfocados principalmente en la capacidad de las algas para metabolizarlo; sin embargo, falta información acerca de cuáles concentraciones son las más apropiadas para el cultivo de microalgas y estudios sobre los efectos de este compuesto en la producción de biomoléculas (Pyle *et al.*, 2008).

El acetato también puede emplearse como fuente de carbono en cultivos mixotróficos microalgales, la incorporación de acetato es un proceso dependiente tanto de metabolismo anabólico (fotosíntesis) como de metabolismo catabólico (respiración) (Bouarab *et al.*, 2004). Investigaciones del crecimiento de microalgas

de diferentes especies en presencia de acetato han sido llevadas a cabo desde hace varias décadas (Payne & Morris, 1969; Quiao & Wang, 2009), sin embargo su uso es problemático ya que su efecto es dependiente de la concentración (Hagen *et al.*, 2001). Algunos autores encuentran que concentraciones superiores a 1 g/l o menos causan inhibición del crecimiento y la intoxicación de las algas (Kobayashi *et al.*, 1993; Chen & Johns, 1994, 1996; Vazhappilly & Chen, 1998; Hagen *et al.*, 2001; Orosa *et al.*, 2001; Jeon *et al.*, 2006), mientras que concentraciones inferiores estimulan el crecimiento y la acumulación de lípidos (Vazhappilly & Chen, 1998; Hagen *et al.*, 2001; Ratledge *et al.*, 2001; Quiao & Wang, 2009; Degrenne *et al.*, 2010), y otros autores encuentran el efecto del acetato en el crecimiento tan mínimo que puede ser ignorado (Hu & Gao, 2003).

1.3. INTEGRACIÓN DEL METABOLISMO DEL CARBONO Y EL NITRÓGENO

Las rutas metabólicas para el carbono y el nitrógeno consumen la mayor parte del carbono y recursos energéticos de la célula fotosintética (Huppe & Turpin, 1994). El metabolismo del carbono y el nitrógeno están vinculados porque comparten carbono orgánico y energía suministrada directamente del transporte de electrones fotosintético y la fijación de CO₂ o de la respiración del carbón fijado vía glicólisis, el ciclo de los ácidos tricarbónicos y la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Huppe & Turpin, 1994). La integración de esos dos procesos metabólicamente importantes involucra una amplia regulación entre las dos rutas (Flynn, 1991). Un incremento en la tasa de asimilación primaria de nitrógeno requiere un incremento del flujo del carbono a través de las rutas biosintéticas, las cuales afectan el metabolismo de toda la célula (Bassham *et al.*, 1981; Syrett, 1988; Turpin, 1991).

1.4. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS

Aproximadamente el 90% del peso seco de la célula se conforma de proteínas, carbohidratos, y lípidos (Hu, 2004). Se han reportado composiciones de especies y cepas del género *Chlorella* como *C. protothecoides*, *Chlorella* sp. CS-272, y *Chlorella* sp. CS-195, las cuales contienen proteínas entre 15,2%-25,6%, carbohidratos 11%-16,1%, y lípidos 11,4%-18,4% en peso seco (Hu, 2004). La biomasa obtenida de algas contiene lípidos, tales como los ácidos grasos libres, triacilglicéridos (TAG), fosfolípidos y glucolípidos los cuales son materia prima para la producción de biodiesel (Wang *et al.*, 2010). El almacenamiento de lípidos no solo depende de la especie y cepa de la microalga, sino también de las condiciones del medio de cultivo (Chisti, 2007; Chih-Hung & Wen-Teng, 2009). Factores ambientales, especialmente luz, temperatura, estado nutricional y salinidad no solo afectan la productividad de biomasa celular, sino también influyen las rutas y actividad del metabolismo celular, y como consecuencia, la dinámica de la composición celular (Hu, 2004).

El porcentaje en peso de lípidos, principalmente ácidos grasos, es inversamente proporcional a la intensidad de luz en la cual las microalgas hayan sido cultivadas (Hu, 2004). La concentración de algunos nutrientes en el medio de cultivo también afecta la productividad de lípidos. Se ha confirmado que condiciones de estrés como la baja concentración de nitrógeno pueden modificar significativamente la composición del organismo, provocando mayor contenido de lípidos (Piorreck *et al.*, 1984; Illman *et al.*, 2000; Rodolfi *et al.*, 2009; Xin *et al.*, 2010). En el caso de *C. vulgaris* Borowitzka & Borowitzka (1988) reportan un rango de 11,8 - 57,9% en peso seco de lípidos bajo diferentes condiciones de cultivo. La deficiencia del fósforo tiene consecuencias similares a las observadas en cultivos con deficiencias de nitrógeno, cesa la división celular y la síntesis de carbono es encaminada al almacenamiento de energía, como carbohidratos o lípidos; por ende los porcentajes de éstos últimos aumentan (Xin *et al.*, 2010).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. INÓCULO

La microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 fue adquirida de la colección de cepas proveniente de la Universidad de Texas (Austin, Tex, USA). Se cultivó en el medio Bold Basal modificado (MBBM), cuya composición en g/l es: NaNO_3 ($2,94 \times 10^{-3}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,04 \times 10^{-4}$) NaCl ($4,28 \times 10^{-4}$), K_2HPO_4 ($4,31 \times 10^{-4}$), KH_2PO_4 ($1,29 \times 10^{-3}$), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,70 \times 10^{-4}$) y micronutrientes (g/l) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,07 \times 10^{-5}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($7,28 \times 10^{-6}$), MoO_3 ($4,93 \times 10^{-6}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($6,29 \times 10^{-6}$), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($1,68 \times 10^{-6}$), H_3BO_3 ($1,85 \times 10^{-4}$), EDTA ($1,71 \times 10^{-4}$), KOH ($5,53 \times 10^{-4}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,79 \times 10^{-5}$).

Se utilizaron reactores cilíndricos tipo “airlift” con un diámetro interno de 14cm y 35cm de altura con un volumen del cultivo de 2 litros. Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo para la inyección de aire con un flujo de 2 l/min.

2.2. RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO

Con el fin de mejorar la productividad de biomasa y lípidos, se probaron diferentes relaciones carbono/nitrógeno en condiciones mixotróficas. Se utilizó acetato de sodio y glicerol residual, el cual se obtuvo de a partir de la transesterificación de aceite de linaza a escala de laboratorio; para evitar ruido por agentes residuales de la transesterificación, el glicerol se pre-trató con 0,5 M de HCl.

Para cada una de estas fuentes de carbono se realizó un diseño de experimentos en el cual se emplearon diferentes fuentes y concentraciones de carbono, y se variaron las concentraciones de nitrato de sodio modificando la composición original del medio Bold Basal (Tabla 1 y 2).

Cada uno de los experimentos (incluyendo el control) se realizaron por triplicado durante cinco días, en ciclos de luz:oscuridad de 12:12 y un flujo de aire de 2 l/min

filtrado, utilizando filtro de membrana de 0,2 μm ; el pH inicial, temperatura e intensidad lumínica fueron $6,5 \pm 1$, $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y $480 \pm 1 \mu\text{mol fotones/m}^2/\text{s}$; los cuales fueron medidos con un pHmetro (SCHOTT® Instruments, Handylab pH 11), termómetro (Brand®) y luxómetro (Loxus LX-107 portátil) respectivamente.

Con base en estudios previos, se agregó un volumen de inóculo suficiente para lograr una concentración celular inicial de aproximadamente 0,4 g/l (peso seco), esto se logró controlando la densidad óptica inicial (aproximadamente 0,8 de absorbancia a 500 nm) utilizando un espectrofotómetro (Spectroquant 300 Merck).

Tabla 1. Diseño experimental para los cultivos con acetato de sodio. T= Tratamiento.

Nitrato de Sodio (mM)	Acetato de Sodio (mM)		
	5	10	20
1,02	T1	T4	T7
1,47	T2	T5	T8
2,94	T3	T6	T9

Tabla 2. Diseño experimental para los cultivos con glicerol residual. T= Tratamiento.

Nitrato de Sodio (mM)	Glicerol residual (% v/v)		
	1	5	10
1,02	T10	T13	T16
1,47	T11	T14	T17
2,94	T12	T15	T18

2.3. PESO SECO

Una vez al día se tomó una muestra de cultivo (2ml) en un tubo de ensayo previamente pesado y se llevo al horno (WTC binder) durante 24 horas a 105 grados centígrados, luego se llevaron a peso constante en un desecador durante 12 horas. La medición se realizó después de alcanzado el peso constante en una balanza analítica con precisión 0,0001 (Precisa Gravimetrics AG).

2.4. CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA

Biomasa es el término usado para describir cualquier material de origen biológico reciente (Crocker, 2010). La biomasa microalgal comúnmente se reporta como peso seco por volumen (OECD, 2011).

Para las mediciones de concentración de biomasa, se tomó una muestra de 6 ml de cada cultivo. Posteriormente se diluyó a una relación muestra:agua destilada de 1:8. Luego se utilizó un espectrofotómetro (Spectroquant® Pharo 300) con el cual se midió la densidad óptica (DO) de cada muestra a una longitud de onda de 500nm (los valores típicos de medición están entre 0,1 – 0,9). El resultado de la regresión entre varias DO y sus respectivos pesos secos permitió determinar la cantidad de biomasa (CB) (g/l) de acuerdo a la ecuación 1 (Franco-Lara *et al.*, 2006):

$$C_B = 1,4602 * DO_{500} \quad (1)$$

2.5. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS

La extracción se realizó siguiendo el protocolo Soxhlet con hexano modificado por González-Delgado y Kafarov (2011), el cual consiste en secar 10 gramos de biomasa a 200°C durante 12 h, después de secada, se hidroliza con una solución 0,5M de HCl durante 30 minutos, se filtra y se somete nuevamente a secado a 125°C durante 3 h. Finalmente, en un papel filtro (tamaño de poro 2 µm) se pesan 5 g de biomasa homogenizada y se ingresa al Soxhlet. El proceso de extracción tuvo una duración de 16 horas.

2.6. PORCENTAJE LIPÍDICO

Comúnmente el contenido lipídico es reportado como porcentaje de peso seco (Griffits & Harrison, 2009). El porcentaje lipídico fue calculado mediante la división del peso de los lípidos y el peso seco de la biomasa a la cual se le realizó la extracción.

2.7. PRODUCTIVIDAD LIPÍDICA VOLUMÉTRICA

Un parámetro comúnmente empleado para la comparación de especies y métodos de cultivo destinados a la producción de biodiesel es la productividad lipídica volumétrica (Nascimento *et al.*, 2012), la cual resume la concentración de biomasa y el contenido lipídico (Griffits & Harrison, 2009), permitiendo contrastar microalgas con diferentes porcentajes lipídicos y tasas de crecimiento y saber cual producirá más cantidad de lípidos al finalizar el cultivo.

En este proyecto, la productividad lipídica es reportada como miligramos de lípidos por litro obtenidos al final del periodo de cultivo (5 días) y fue calculada multiplicando la concentración de biomasa por el porcentaje lipídico (Griffits & Harrison, 2009).

2.8. CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO Y FÓSFORO CONSUMIDO

Para la cuantificación de Nitrógeno ($\text{NO}_3\text{-N}$) se utilizó el método de muestreo por espectrofotómetro ultravioleta y para el fósforo ($\text{PO}_4\text{-P}$) se utilizó el método colorimétrico de ácido vanadomolibdofosfórico; estos métodos se encuentran consignados en el Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (Clesceri *et al.*, 1999).

Cuantificación de Nitrógeno ($\text{NO}_3\text{-N}$) en el medio (método espectrofotométrico ultravioleta)

Se tomaron 50 ml de medio de cultivo libre de células y se agregó 1 ml de solución de HCl 1 N y se agitó vigorosamente, después de 10 minutos, la muestra se leyó a 220 y 275 nm. Los valores fueron reemplazados en la siguiente ecuación 2:

$$\text{valor corregido} = (2 \times \lambda_{275}) - \lambda_{220} \quad (2)$$

Cuantificación de Fósforo (PO₄-P) en el medio (método colorimétrico de ácido vanadomolibdofosfórico)

Se tomaron 30 ml de medio libre de células, luego se agregaron 10 ml de solución de Metavanadato-Molibdato y se aforó con agua destilada hasta un volumen de 50 ml. Después de 10 minutos la muestra se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 470 nm.

Porcentaje de nitrógeno y fósforo consumido

Las concentraciones de nitrógeno y fósforo presentes en el medio fueron calculadas usando una curva de calibración realizada con concentraciones conocidas. Posteriormente se calcularon los porcentajes presentes en el medio (%PM) de acuerdo a la ecuación 3:

$$\% PM = \frac{(CI - CP)}{CI} \quad (3)$$

Donde CI es la concentración inicial, en el caso del fosfato es la concentración del medio Bold Basal y en el caso del nitrato, la concentración inicial de nitrato para cada tratamiento. A continuación se calcularon los porcentajes de nitrato y fosfato consumidos, restándole a 1 el porcentaje presente en el medio.

Debido a la turbidez que ocasionaba el glicerol en el medio de cultivo, no fue posible medir el nitrógeno ni el fósforo disponibles en los tratamientos que empleaban glicerol residual como fuente de carbono para *C. vulgaris*.

2.9. MEDICIÓN DE PH

Se realizaron mediciones esporádicas de pH con un pH-metro (SCHOTT® Instruments, Handylab pH 11) con el fin de observar que las microalgas no estuvieran en condiciones de acidez o basicidad extremas.

2.10. ANÁLISIS DE DATOS

Se realizaron pruebas *a priori* de Shapiro-Wilk para determinar normalidad y Levene para determinar homogeneidad de varianzas (Zar, 1999) en cada variable.

Para identificar si existían diferencias significativas en la producción de biomasa se utilizó una ANOVA factorial, siendo los factores las diferentes concentraciones de nitrato de sodio, glicerol residual y acetato de sodio. Dado que en solo uno de los tratamientos no se cumplía con la normalidad, se asumió que los datos cumplían con los parámetros necesarios para el ANOVA. Se realizó una prueba *a posteriori*, de Tukey, para las variables que reportaron diferencias significativas en el ANOVA ($p > 0,05$).

Se realizaron pruebas de X^2 para evaluar si existían diferencias significativas en porcentajes lipídicos entre los tratamientos y el control, y entre el consumo de nitrógeno y fósforo entre los tratamientos con acetato.

Con el fin de establecer si existía relación entre la producción lipídica y el consumo de nutrientes se realizó una regresión múltiple. Todas las pruebas estadísticas se ejecutaron con el software STATISTICA V. 7.0 (Statsoft Inc, 2004).

3. RESULTADOS

Las variables e interacciones que influyeron significativamente en la concentración de biomasa final se muestran en la tabla 3. Se observaron diferencias en la concentración de biomasa entre el control y los tratamientos a los cuales se les suministraron diferentes concentraciones de acetato de sodio ó glicerol residual (tabla 3 y figura 1).

Tabla 3. Variables e interacciones entre variables estadísticamente significativas en la concentración de biomasa.

Variables	n	gl	F	P
Concentración NaNO ₃	78	2	7,765	0,0000
Concentración de carbono	78	3	16,641	0,0008
Tratamiento (acetato, glicerol, control)	78	2	7,953	0,0007
Conc. de NaNO ₃ * Conc. de carbono	78	6	2,338	0,0405

n número de datos. **gl** grados de libertad. **F** valor de la distribución F. **P** probabilidad.

Debido a que se realizó una comparación global, se observan varios datos extremos y atípicos pertenecientes a tratamientos cuyo crecimiento fue marcadamente bajo ó alto. El amplio rango de concentraciones de biomasa observado en la figura 1 está influenciado por la concentración de nitrógeno, la concentración de carbono orgánico y la interacción entre esos dos factores. Se encontró que los tratamientos con 2,94mM de NaNO₃ aumentaron más biomasa que los tratamientos a los cuales se les suministró una concentración menor.

La comparación global hacía difícil la identificación de diferencias entre los tratamientos, por ende, se dividieron los datos de la ANOVA global en: control vs. Tratamientos con acetato de sodio y control vs. Tratamientos con glicerol.

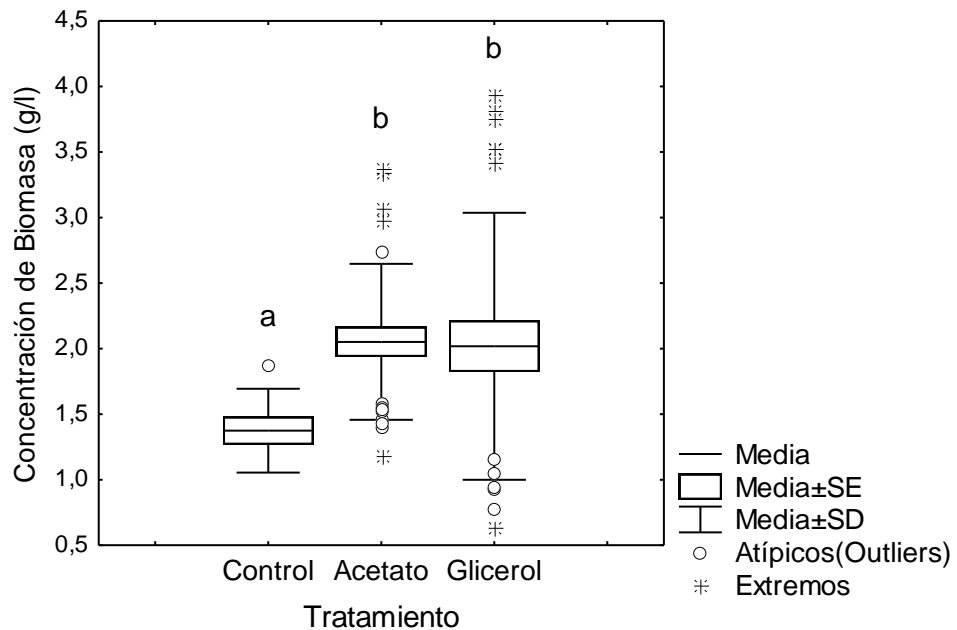


Figura 1. Concentraciones de biomasa finales de los de las diferentes fuentes de carbono orgánico. Las letras diferentes indican diferencias significativas detectadas mediante el test de Tukey.

Se encontró que la concentración de acetato favoreció el aumento de biomasa $F_{(3,24)}=28,989$, $P=0,00000$. Se observaron diferencias significativas en las concentraciones de biomasa entre los tratamientos con acetato de sodio y el control (figura 2).

Los tratamientos con 10mM de acetato presentaron un aumento significativo con respecto al control. Los tratamientos con 20mM de acetato alcanzaron concentraciones de biomasa significativamente más altas que los demás tratamientos y el control.

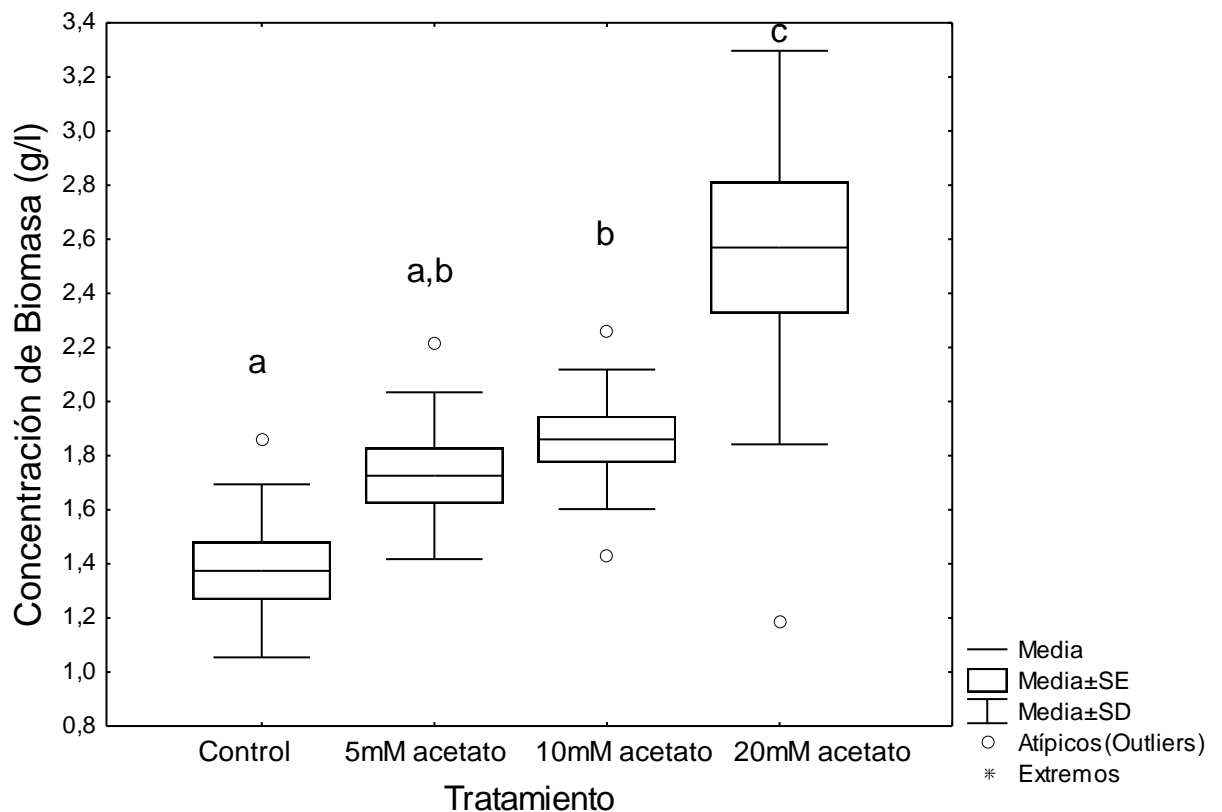


Figura 2. Concentraciones de biomasa finales de los tratamientos con acetato de sodio. Las letras diferentes indican diferencias significativas detectadas mediante el test de Tukey.

La interacción entre las variables concentración de nitrógeno y concentración de acetato fue significativa $F_{(6, 24)}=5,0487$, $P=0,00178$ (figura 3). Se distinguen los tratamientos con 2,94mM de nitrato-20mM de acetato, y 1,47mM de nitrato-20mM de acetato como los causantes de esa diferencia en la concentración de biomasa, el dato atípico observado en la figura 2 pertenece a una de las réplicas del tratamiento con 1,02mM de nitrato-20mM de acetato. Se perciben diferencias significativas entre los cultivos control con 1,02 y 1,47 mM NaNO_3 y los cultivos con 2,94mM NaNO_3 -10mM de acetato.

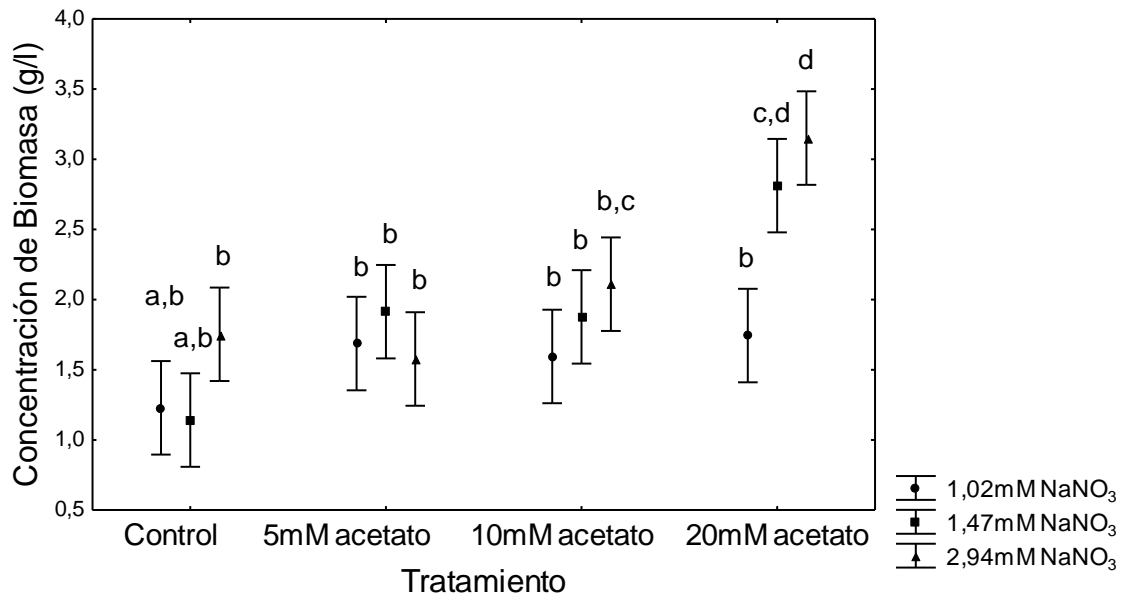


Figura 3. Concentración de biomasa en las interacciones acetato de sodio-nitrato. Las letras diferentes indican diferencias significativas en las interacciones acetato-nitrato detectadas mediante el test de Tukey.

Se hallaron diferencias en la concentración de biomasa según la concentración de glicerol suministrada $F_{(3, 24)}=6,303$, $P=0,0026$. Las concentraciones de biomasa obtenidas de los tratamientos con glicerol residual y control pueden observarse en la figura 4.

Los tratamientos suplementados con 10%v/v de glicerol tuvieron un aumento de biomasa significativo en comparación con 1%v/v de glicerol y el control, por otro lado, los tratamientos suministrados con 5%v/v de glicerol exhibieron un amplio rango de concentraciones de biomasa sin mostrar diferencias con el control o con los demás porcentajes de glicerol empleado.

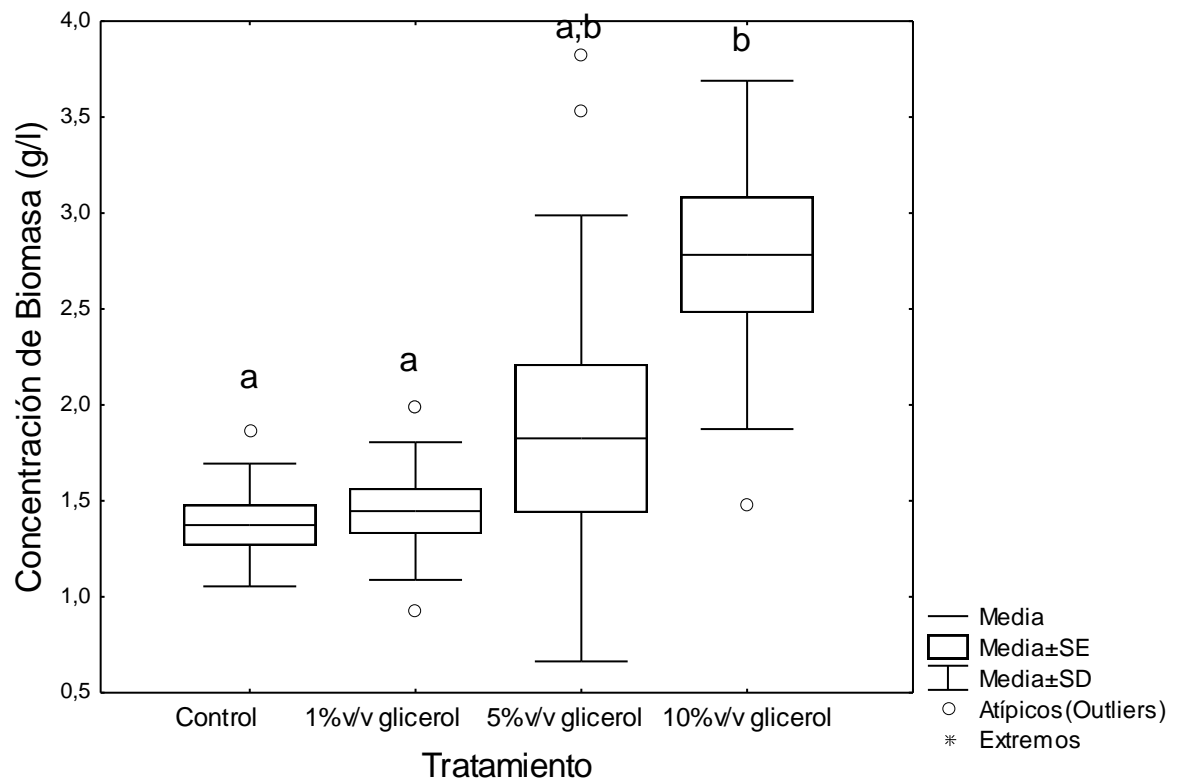


Figura 4. Concentraciones de biomasa finales resultantes de los tratamientos con glicerol. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las dosis de glicerol.

La interacción entre las variables concentración de glicerol-concentración de nitrato no resultó significativa en el aumento de biomasa; sin embargo, se observó que las concentraciones de biomasa del tratamiento que 5%v/v glicerol-1,02mM nitrato influyeron en la amplia variación apreciada en los cultivos con 5%v/v de glicerol en la figura 4. La diferenciación entre los cultivos suplementados con 10% de glicerol y los suplementados con 1% de glicerol y control no fue ocasionada por un único tratamiento glicerol-nitrato (figura 5).

Se pueden distinguir los datos extremos dentro de las concentraciones de glicerol según tratamiento de nitrato (figura 5). Se percibe que los datos atípicos en el control pertenecen a cultivos con 2,94mM de nitrato, en los tratamientos con

1%v/v de glicerol hay datos atípicos en todas las concentraciones de nitrato. En las concentraciones de glicerol restantes los datos atípicos pertenecen a tratamientos con 1,02mM de nitrato.

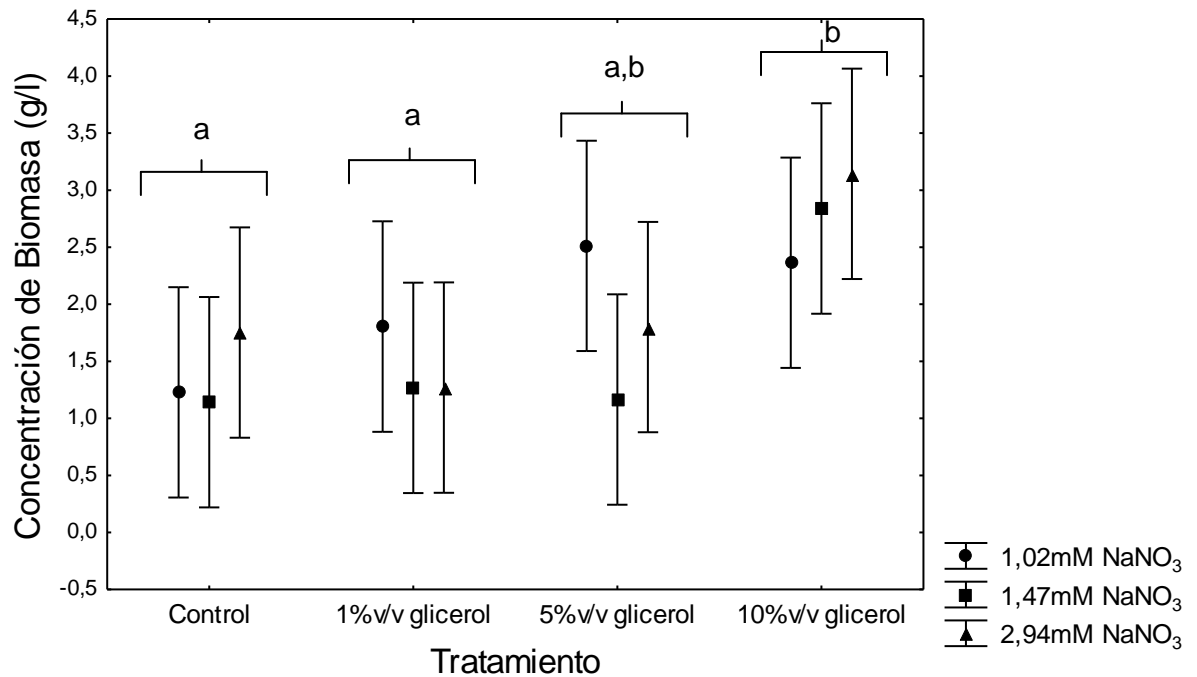


Figura 5. Concentración de biomasa en las interacciones glicerol-nitrato y el control. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre concentraciones de glicerol.

El porcentaje lipídico presentó diferencias significativas entre los tratamientos a los cuales se les suministró 1,47mM de nitrato ($X^2_{(3,0,05)} = 9,55$; $P > 0,025$). Las diferencias de porcentajes lipídicos entre el control y los tratamientos con acetato-1,47mM de nitrato se distinguen en la figura 6.

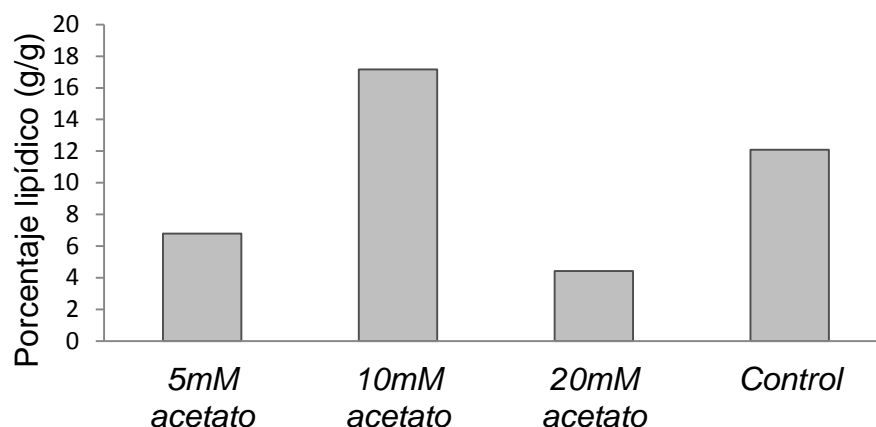


Figura 6. Porcentajes lipídicos en el control y los tratamientos con 1,47mM de NaNO_3 y acetato.

La productividad lipídica presentó diferencias significativas entre el control y los tratamientos suplementados con acetato de sodio ó glicerol residual (tabla 4, figura 7 y 8). Se pueden apreciar las diferencias entre productividades lipídicas en la figura 7, para los tratamientos con acetato de sodio, y en la figura 8 para los tratamientos con glicerol residual.

Tabla 4. Tabla de resultados de χ^2 para productividad lipídica.

Concentración de acetato/glicerol vs control	χ^2	gl	P
5mM acetato de sodio	58,5	3	<0,001
10mM acetato de sodio	148,3	3	<0,001
20mM acetato de sodio	77,7	3	<0,001
1%v/v glicerol residual	10,8	3	>0,01
5%v/v glicerol residual	138,2	3	<0,001
10%v/v glicerol residual	109,3	3	<0,001

χ^2 valor prueba de chi cuadrado. **gl** grados de libertad. **P** probabilidad.

Las productividades lipídicas variaron considerablemente de acuerdo a las interacciones C/N en los cultivos suplementados con acetato, mientras que en los cultivos suplementados con glicerol no fue observado globalmente el mismo fenómeno.

Las diferencias más relevantes fueron las siguientes: en los tratamientos con 5mM acetato de sodio se presentaron productividades lipídicas menores a las del control, el tratamiento con 10mM acetato-1,47mM nitrato exhibió una productividad lipídica mayor a la esperada mientras que los demás tratamientos con 10mM de acetato presentaron productividades lipídicas menores a las esperadas y al control. El tratamiento con 20mM de acetato-1,02mM nitrato presentó productividades superiores a las esperadas y al control; por otro lado, los tratamientos con 20mM de acetato y concentraciones de nitrato más altas mostraron productividades lipídicas más bajas que las esperadas.

Para los tratamientos con glicerol residual, las mayores productividades lipídicas fueron: 1%v/v glicerol-1,94mM nitrato, 5%v/v glicerol-1,02mM nitrato y todos los tratamientos con 10%v/v de glicerol. Los demás tratamientos presentaron productividades más bajas que las esperadas y el control.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el consumo de nitrógeno ($X^2_{(4;0,05)} = 7,47$; $P > 0,05$) ni en el consumo de fósforo ($X^2_{(4;0,05)} = 7,42$; $P > 0,05$). No se encontró una relación entre el porcentaje lipídico, concentración de biomasa, ni productividad lipídica y consumo de nitrógeno y fósforo ($R^2 = 0,197$; $P = 0,70$).

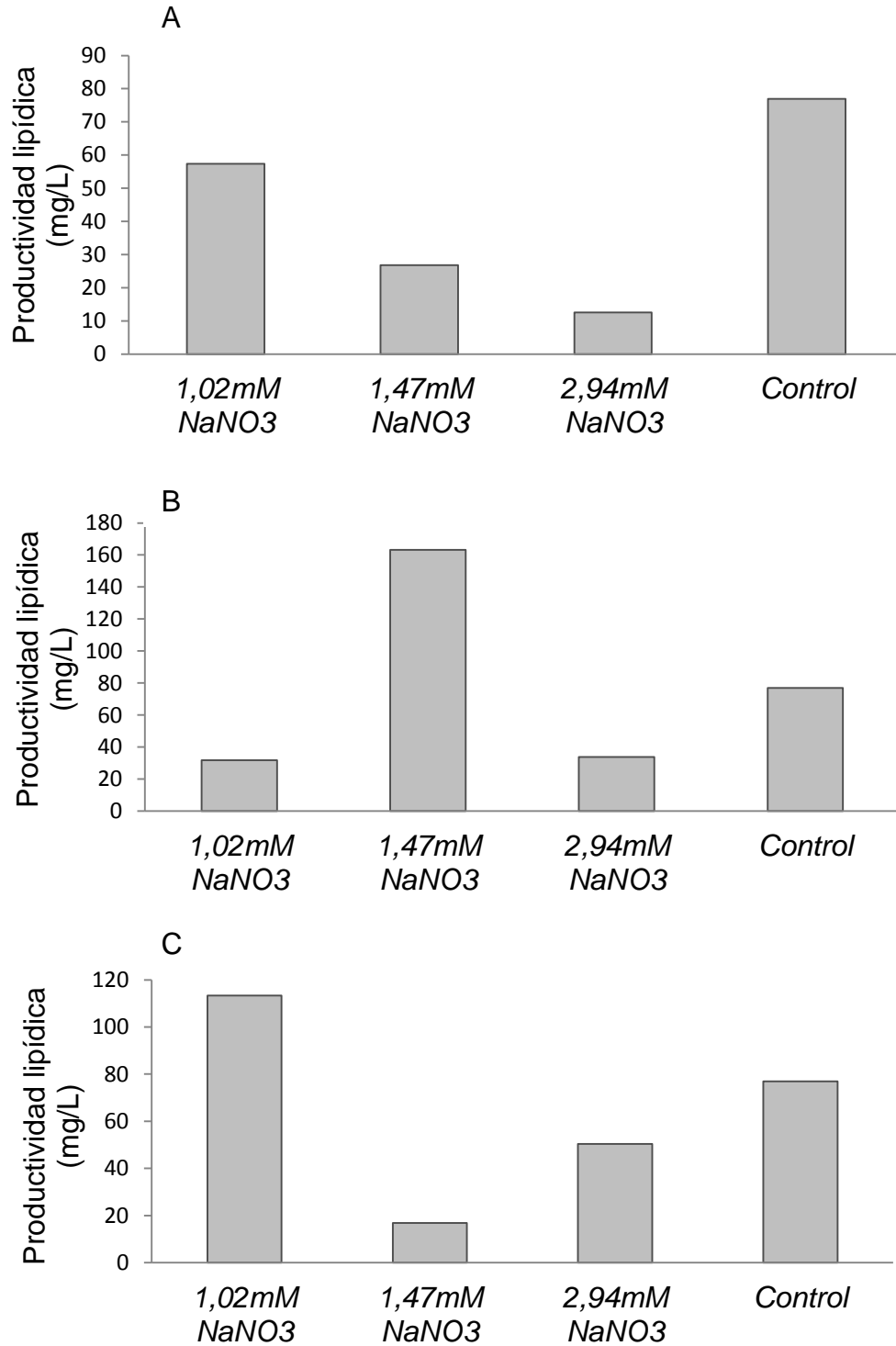


Figura 7. Productividades lipídicas en el control y tratamientos a los cuales se adicionó acetato de sodio (A) 5mM acetato de sodio, (B) 10mM de acetato de sodio y (C) 20mM de acetato de sodio.

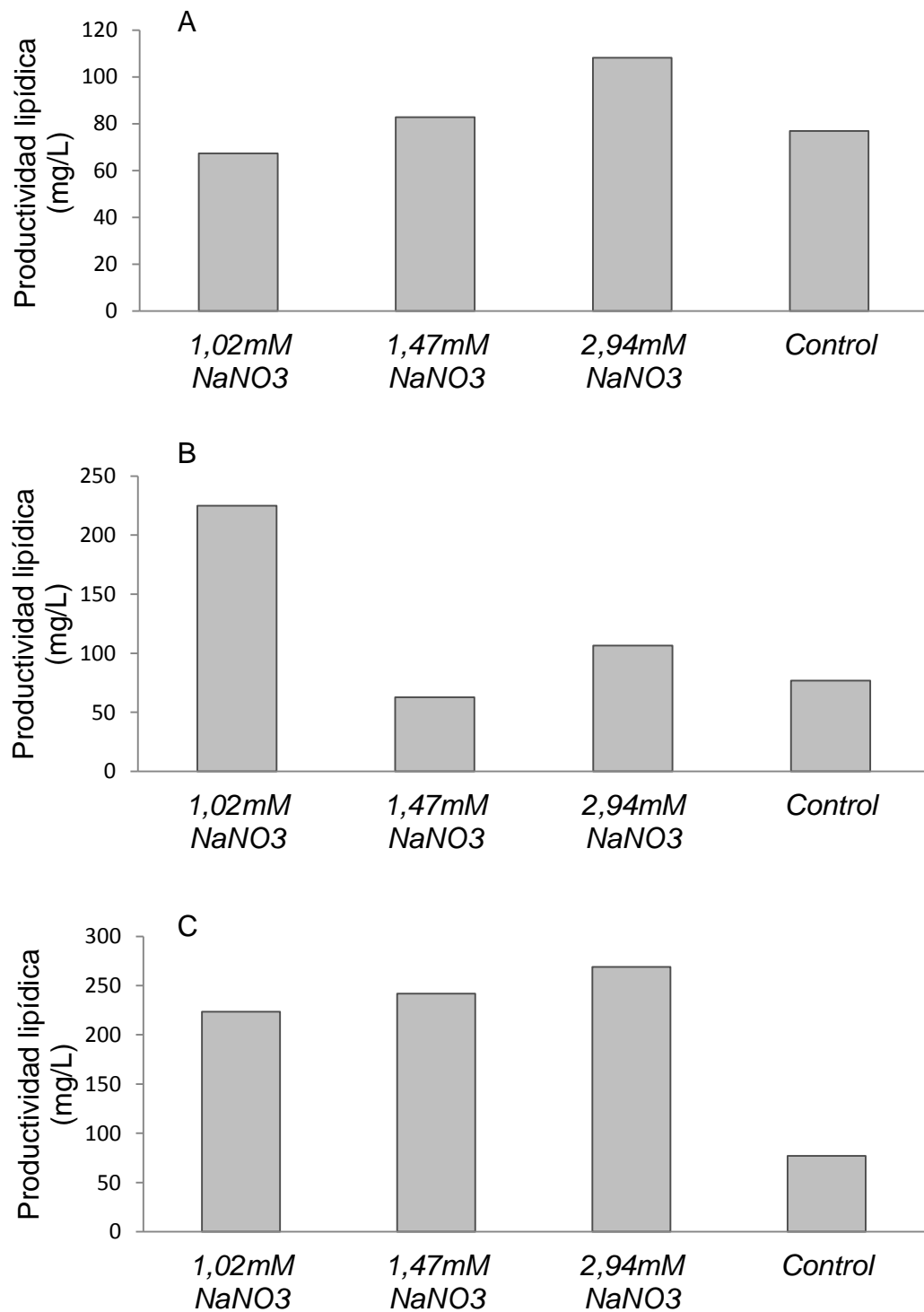


Figura 8. Productividades lipídicas en el control y tratamientos a los cuales se adicionó glicerol residual (A) 1%v/v glicerol residual, (B) 5%v/v glicerol residual y (C) 10%v/v glicerol residual.

4. DISCUSIÓN

Chlorella vulgaris presentó incrementos significativos en la biomasa dependiendo de factores como concentración de acetato de sodio ó glicerol residual y concentración de nitrato. Las concentraciones de biomasa significativamente más altas fueron obtenidas mediante los tratamientos 10mM de acetato-1,47mM nitrato, 10mM acetato-2,94mM nitrato y los tratamientos suplementados con 10%v/v de glicerol.

Se observó que el aumento de biomasa fue dependiente de la concentración de acetato o glicerol suministrado, en concordancia con estudios previos en algas del género *Chlorella* en los cuales la concentración de diversas fuentes de carbono orgánico como glucosa (Doucha & Lívanský, 2011; Heredia-Arroyo *et al.*, 2011), fructosa (Camacho-Rubio *et al.*,1988), acetato (Heredia-Arroyo *et al.*, 2011) y aguas residuales de la producción de aceite de oliva (Sánchez *et al.*, 2001) influyó el crecimiento de las microalgas.

El aumento de biomasa probablemente se debe a la incorporación del acetato transformado en acetyl-CoA por la acetyl-CoA sintetasa, y posteriormente oxidado a través del ciclo del glioxilato ó del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC), lo cual provee de esqueletos de carbono, energía como ATP y NADH (Syrett *et al.*, 1963). Merret & Syrett (1960) estudiaron rutas de asimilación de acetato y descubrieron que el acetato es oxidado rápidamente. En el caso del glicerol a la conversión por medio de la glicerol quinasa, glicerol 3-fosfato oxidoreductasa y la triosa fosfato isomerasa a gliceraldehido-3-fosfato y glicerato, los cuales son intermediarios en la ruta glucolítica o ruta de Embden-meyerhof-Parnas (EMP) para formar piruvato que ingresa al ciclo de ATC (Neilson & Lewin, 1974).

Estudios realizados por Doucha & Livansky (2011) heterotróficamente en *Chlorella vulgaris* reportan aumentos de 1200% en cantidad de biomasa pero son empleando 97,5 g/L de glucosa, lo cual es inaceptable porque los costos de

producción de biodiesel serían muy altos, además no deben existir vínculos entre la producción de biocombustibles y los alimentos. El presente proyecto muestra el potencial de la utilización de acetato y glicerol residual para la producción de biomasa destinada a ser convertida en biodiesel, debido a que se produjeron aumentos significativos del 685% de biomasa empleando bajas concentraciones de compuestos económicos que no comprometen la alimentación humana y que originan porcentajes lipídicos mayores (18%) que los obtenidos mediante el cultivo heterotrófico realizado por Doucha & Livansky (2011) 9,7%.

La variación en las concentraciones de nitrato afectó el aumento de biomasa, Barsanti & Gualtieri (2006) sugieren una explicación a éste fenómeno, debido a que a nivel bioquímico, las limitaciones en nitrógeno influyen directamente en la formación de aminoácidos, limitando la traducción del mRNA y reduciendo la síntesis de proteínas. Las cuales a su vez, están involucradas en aspectos del crecimiento que incluyen procesos estructurales y metabólicos, como la síntesis enzimática (Barsanti & Gualtieri, 2006).

En los tratamientos con acetato las interacciones carbono/nitrógeno influenciaron significativamente la acumulación de biomasa, este hecho puede ser causado porque la actividad de la isocitrato liasa, enzima clave del ciclo del glioxilato, depende de la disponibilidad de nitrógeno (Morris & Syrett, 1965). Dicha actividad disminuye cuando *Chlorella* tiene poca concentración de nitrógeno (Morris & Syrett, 1965), afectando una de las posibles vías para la metabolización del acetato.

Los datos atípicos encontrados en acumulación de biomasa, pueden deberse a cultivos con microalgas fotoinhibidas, a fluctuaciones no percibidas en el pH, o a alguna otra variación no registrada en las condiciones de cultivo; en el caso de las microalgas tratadas con acetato o glicerol, a cultivos con fases de adaptación muy cortas o largas. Se han reportado en la microalga *Phaeodactylum tricoratum* fases de adaptación al glicerol de hasta 70 horas (Cerón-García *et al.*, 2000).

Esas posibles fases de adaptación inusuales en tratamientos con acetato, se deben a que en *C. vulgaris*, la isocitrato liasa, es sintetizada constitutivamente; pero el ciclo de glioxilato únicamente es funcional durante el crecimiento en acetato (Harrop & Kornberg, 1966). Por ende, no todas las células reaccionan inmediatamente haciendo funcional su ciclo de glioxilato, ocasionando diferentes tiempos de adaptación y asimilación del acetato (Syrett *et al.*, 1963).

Existe evidencia (Rachlin & Grosso, 1991) de que la acidez o alcalinidad del medio retarda el crecimiento de *C. vulgaris*, sin embargo, el rango de pH que soporta esta microalga es de 3.0 a 9.0. La adición de glicerol en el medio causó un descenso en el pH, y una concentración de 15%v/v excedió la capacidad amortiguadora del buffer de fosfatos, disminuyendo el pH a 2 (datos no mostrados), e impidiendo la supervivencia de las células. Por ende la concentración más alta tolerada por *C. vulgaris* fue de 10%v/v de glicerol.

Algunas investigaciones reportadas en la literatura (Kaya *et al.*, 1996; Orosa *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2006; Gouveia *et al.*, 2009) se enfocan en la relación carbono/nitrógeno (C/N) como una forma para la producción de lípidos sin necesidad de modificar genéticamente el organismo y aprovechando las características de los ciclos metabólicos inherentes de estos microorganismos. Según la hipótesis del balance C/N cuando la tasa del metabolismo del nitrógeno se reduce por limitaciones en la concentración de nitrato, se acumulan compuestos de reserva, como los lípidos y el almidón (Rufty *et al.*, 1988; Foyer *et al.*, 1993, 1994). En el presente estudio no se encontró una relación entre la concentración de nitrógeno y el porcentaje lipídico, observación apoyada por los resultados de Pérez-García *et al.* (2011). En este orden de ideas, solo la relación C/N 10mM acetato-1,47mM nitrato influyó positivamente el porcentaje lipídico. Indicando que otro factor metabólico además del balance C/N estaría interviniendo.

La acumulación lipídica puede que no esté relacionada únicamente con el aumento de las enzimas que sintetizan lípidos por el déficit de nitrógeno, sino al cese de otras enzimas asociadas con el crecimiento y la proliferación celular y la propagación de enzimas específicamente relacionadas a la acumulación de lípidos (Ratledge & Wynn, 2002; Ganuza *et al.*, 2008). También se ha reportado una duplicación y triplicación en el contenido lipídico cuando las algas están sometidas a estrés fotooxidativo o a variaciones en el pH (Hu *et al.*, 2008),

Una vía de ensamble de ácidos grasos de cadena larga inicia a partir del acetato y la proteína portadora de acilo (ACP) mediante uniones carbono-carbono, empezando como acetil-coA y finalizando con acil-ACP (Pérez-García *et al.*, 2011). Para esta ruta, un ácido graso típico de 18 carbonos, son requeridas 16 moléculas de NAD(P)H. En la oscuridad, la ruta de pentosas fosfato es la productora del NADPH reducido (Somerville *et al.*, 2000). No se conoce una ruta similar para la producción de lípidos a partir de glicerol, es probable que debido a que las rutas de metabolización del glicerol requieren de más pasos, no se haya encontrado un aumento significativo en el porcentaje lipídico, hipótesis que debe ser comprobada.

Se encontraron diferencias significativas entre la productividad lipídica volumétrica de tratamientos con acetato, glicerol residual y control. Debido a que ésta se relaciona con la concentración de biomasa y lípidos (Liang *et al.*, 2009) las variaciones positivas fueron resultado de porcentajes lipídicos altos y concentraciones de biomasa que no presentaron diferencias significativas, como es el caso del 1,47mM nitrato-10mM acetato; ó concentraciones de biomasa significativamente altas y porcentajes lipídicos comunes, como es el caso de los tratamientos suplementados con 10%v/v de glicerol.

Se observó que ningún tratamiento presentó diferencias significativas tanto en la variable concentración de biomasa como en la de porcentaje lipídico. Con frecuencia se obtienen altos porcentajes de lípidos cuando las algas son

sometidas a condiciones de estrés impuestas por estímulos físicos y químicos (Hu *et al.*, 2008), lo cual comúnmente es asociado a baja productividad de biomasa y por consiguiente, a baja productividad lipídica (Loera-Quesada & Olguín, 2010).

La respuesta de las microalgas a condiciones de estrés es variable, algunas de esas respuestas implican cambios morfológicos, cese de la actividad celular y modificación de procesos metabólicos (Ben-Amotz *et al.*, 1985). La acumulación de lípidos a pesar de la atenuación de la división celular, es consecuencia de la asimilación continua de carbono y su orientación hacia la síntesis activa de ácidos grasos. Bajo tales circunstancias los lípidos son empleados por la célula como reserva de carbono y energía, además de proteger al organismo del estrés fotooxidativo (Thompson, 1996; Grossman & Takahashi, 2001; Hu *et al.*, 2008).

El presente proyecto, aporta nuevo conocimiento acerca de las concentraciones de glicerol residual y acetato de sodio más favorables para la producción de biomasa y lípidos, además de las relaciones carbono-nitrógeno que deben ser consideradas para tales propósitos. Contribuyendo a estimaciones preliminares para generar biomasa microalgal destinada a la producción de biocombustibles a gran escala de forma ambiental y económicamente viable.

5. CONCLUSIONES

Chlorella vulgaris asimiló exitosamente el acetato de sodio en los tratamientos 20mM acetato-1,47mM nitrato y 20mM acetato-2,94mM nitrato con una influencia significativamente positiva en el aumento de biomasa. En el caso del glicerol residual la concentración 10%v/v resultó significativamente favorecedora en el aumento de biomasa.

El porcentaje lipídico incrementó significativamente en el tratamiento con 10mM acetato-1,47mM nitrato, sin embargo, no se encontró un patrón o relación con el balance carbono/nitrógeno ni con el consumo de fosfatos y nitratos. Dicho incremento metabólico pudiera estar influenciado por factores internos como la modulación enzimática o externos como el estrés fotooxidativo y el pH, hipótesis que deben ser evaluadas.

La productividad lipídica estuvo influenciada por la interacción entre las concentraciones de carbono orgánico y las de nitrato, a excepción de los cultivos suplementados con 10%v/v de glicerol, en los cuales la productividad lipídica fue significativamente alta en todos los niveles de nitrato. Por consiguiente, se considera que el cultivo mixotrófico de *C. vulgaris* puede llevarse a cabo favorablemente empleando concentraciones particulares de nitrato y acetato de sodio ó glicerol residual para la producción de biomasa destinada a ser convertida en biodiesel.

6. BIBLIOGRAFÍA

Alhanash, A., Kozhevnikova, E.F. & Kozhevnikov, I.V. 2008. Hydrogenolysis of glycerol to propanediol over Ru:polyoxometalate bifunctional catalyst. *Catalysis Letters* 120: 307-311.

Barsanti, L. & Gualtieri, P. 2006. *Algae : Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press. 320 pp.

Bassham, J.A., Larsen, P.O., Lawyer, A.L. & Cornwell, K.L. 1981. Relationships between nitrogen metabolism and photosynthesis. En: Bewley, J.D. (Ed), *Nitrogen and Carbon Metabolism*. p. 135-163. London.

Becker, E. 1994. Measurement of alga growth. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. 293 pp.

Ben-Amotz, A., Tornabene, T.G. & Thomas, W.H. 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *Journal of Phycology* 21: 72-81.

Beneman, J.R. & Hughes, E. 1997. Biological fossil CO₂ mitigation. *Energy Convers. Manage.* 38: 467–473.

Bewicke, D. & Potter, D.A. 1984. *Chlorella: The Emerald Food*. Ronin Publishing. 120pp.

Bouarab, L. Dautab, A. & Loudikia, M. 2004. Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micractinium pusillum fresenius* in the presence of acetate and glucose:effect of light and acetate gradient concentration *Water Research* 38: 2706–2712.

Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. 1988. *Microalgal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press. 477 pp.

Brown, R. 2007. Biodiesel Co-Product Markets in Wyoming for Wyoming Department of Agriculture. Lakewood, CO: International Center for Appropriate & Sustainable Technology. Disponible en:

http://www.icastusa.org/images/projects/biodiesel/biodiesel_coproduct_markets.pdf

Buchanan, B., Grisse, W. & Jones, R. 2000. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *American Society of Plant Physiologists*: 630-728.

Camacho-Rubio, F., Martínez-Sancho, M.E. & Sánchez-Villasclaras, S. 1988. Consumo de monosacáridos por *Chlorella pyrenoidosa*, *Anales de Química*. 85: 313-316

Cerrate, S., Yan, F., Wang, Z., Coto, C., Sacakli, P. & Waldroup, P.W. 2006. Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. *International Journal of Poultry Science* 5(11): 1001-1007.

Cerón-García, M.C., Fernández-Sevilla, J.M., Acién-Fernández, F.G., Molina-Grima, E. & García-Camacho, F. 2000. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricorutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. *Journal of Applied Phycology*, 12: 239–248.

Chen, F. & Jiang, Y. 2000. Algae and their biotechnological potential: proceedings of the 4th Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology. Hong Kong: s.n.

Chen, F. & Johns, M. 1994. Substrate Inhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* by Acetate in Heterotrophic Culture, *Process Biochemistry*. 29:245–252.

Chen, F. & Johns, M. 1996. High cell density culture of *Chlamydomonas reinhardtii* on acetate using fed-batch and hollow-fibre cell-recycle systems. *Bioresource Technology*. 55: 103–110.

Chen, F. & Zhang, Y. 1997. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enzyme and Microbial Technology* 20(3):221-224.

- Chi, Z., Pyle, D., Wen, Z., Frear, C. & Chen, S.** 2007. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochemistry* 42: 1537–1545.
- Chih-Hung, H. & Wen-Teng, W.,** 2009. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresource Technology*.17: 3921-3926.
- Chisti, Y.** 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25: 294–306.
- Chisti, Y.** 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnology* 26,126–131.
- Chojnacka, K. & Márquez, F.** 2004. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*, 3:21-34.
- Clesceri, L.S., Greenberg, A.E. & Eaton, A.D.** 1999. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF). 2: 1325 pp.
- Cohen, Z.** 1999. *Porphyridium cruentum*. *Chemicals from microalgae*: 41-56.
- Crocker, M.** 2010. Thermochemical Conversion of Biomass to Liquid Fuels and Chemicals. Royal Society of Chemistry, 532pp.
- Crutzen, P.J., Mosier, A.R., Smith, K.A. & Winiwarter, W.** 2008. N₂O release from agrobiofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. *Atmospheric. Chemistry & Physics*. 8: 389–395.
- Dasari, M.A., Kiatsimkul, P., Sutterlin, W.R. & Suppes, G.J.** 2005. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. *Applied Catalysis A: General* 281: 225-231.

Degrenne, B., Pruvost, J., Christophe, G., Cornet, J., Cogne, G. & Legrand, J. 2010. Investigation of the combined effects of acetate and photobioreactor illuminated fraction in the induction of anoxia for hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*, *International Journal of Hydrogen Energy* 102 (2): 1035–1043.

Doucha, J. & Lívanský, K. 2011. Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters. *Journal of Applied Phycology*. doi:10.1007/s10811-010-9643-2.

Droop, M.R. 1974. Heterotrophy of carbon. En: Stewart, W.D.P. (Ed.), *Algal Physiology and Biochemistry*. Blackwell Scientific, Oxford, UK, 530-559.

Des Abbayes, H., Chadefaud, M., Feldmann, J., de Ferré, Y., Gausсен, H., Grassé, P. & Prevot, A. 1989. Clasificación de las algas. Botánica. Vegetales Inferiores. Reverté, Barcelona, 748 pp

Endo, H., Sansawa, H. & Nakajima, K. 1977. Studies on *Chlorella regularis*, heterotrophic fast-growing strain II. Mixotrophic growth in relation to light intensity and acetate concentration. *Plant & Cell Physiology*. 18: 199-205.

Fernández, F., Camacho, F., Pérez, J., Sevilla, J. & Grima, E. 1997. A Model for Light Distribution and Average Solar Irradiance Inside Outdoor Tubular Photobioreactors for the Microalgal Mass Culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 55:701-714.

Fernández, F., Camacho, F., Pérez, J., Sevilla, J. & Grima, E. 1998. Modeling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: Effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance. *Biotechnology and Bioengineering*, 58:605–616.

- Flynn, K.J.** 1991. Algal carbon-nitrogen metabolism: a biochemical basis for modelling the interactions between nitrate and ammonium uptake. *Journal of Plankton Research*. 13 (2):373-387.
- Franco-Lara, E., Havel, J., Peterat, F. & Weuster-Botz, D.** 2006. Model-Supported Optimization of Phototrophic Growth in a Stirred-Tank Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 95(6): 1177-1187.
- Foyer, C.H., Lefebvre, C., Provot, M., Vincentz, M. & Vaucheret, H.** 1993. Modulation of nitrogen and carbon metabolism in transformed *Nicotiana plumbaginifolia* mutant E23 lines expressing either increased or decreased nitrate reductase activity. En: White, E., Kettlewell, P.S., Parry, M.A. & Ellis, R.P. (Eds), 137-145. *Physiology of Varieties*. Association of Applied Biologists, Wellesbourne Wawick.
- Foyer, C.H., Lescure, C., Lefebvre, C., Morot-Gaudry, J.F., Vincentz, M. & Vaucheret, H.** 1994. Adaptation of photosynthetic electron transport, carbon assimilation and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to changes in nitrate reductase activity. *Plant Physiology*, 104: 171-178.
- Ganuza, E., Anderson, A.J. & Ratledge, C.** 2008. High-cell-density cultivation of *Schizochytrium* sp. in an ammonium/pH auxostat fed-batch system. *Biotechnology Letters*, 30: 1559 -1564.
- Gavrilescu, M. & Chisti, Y.** 2005. Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*, 23:471–99.
- González-Delgado, A. & Kafarov, V.** 2011. Protocolo de extracción de aceite de microalgas. Proyecto bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel. Instituto Colombiano del Petróleo - Universidad Industrial de Santander.

- Goulding, K. & Merrett, M.** 1966. The Photometabolism of Acetate by *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Experimental Botany*, 17(4):678-689.
- Gouveia, L., Marques, A.E., Silva, L. & Reis, T.A.** 2009. *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36:821–826.
- Griffits, M.J. & Harrison, S.T.** 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 21(5):493-507.
- Grossman, A. & Takahashi, H.** 2001. Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52:163-210.
- Hagen, C., Grünewald, K., Xyländer, M. & Rothe, E.** 2001. Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Applied Phycology*, 13:79–87.
- Harris, P. & James, A.** 1969. The effect of low temperatures on fatty acid biosynthesis in plants. *Journal Biochemistry*, 112:325–330.
- Harrop, L.C. & Kornberg, H.L.** 1966. The role of isocitrate lyase in the metabolism of algae. *Proc. R. Soc. London* 166, 11e29.
- Heredia-Arroyo, T., Wei, W. & Hu, B.** 2010. Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162:1978–1995.
- Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Ruan, R. & Hu, B.** 2011. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass and Bioenergy*, 35: 2245-2253.

Hernández, J.P., Bashan, L.E. & Bashan, Y. 2006. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella sp.* co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 190–198.

Holm-Nielsen, J. Lomborg, C., Oleskowicz, P. & Ebensen, K. 2008. On-line near infrared monitoring of glycerol-boosted anaerobic digestion processes: evaluation of process analytical technologies. *Biotechnology and Bioengineering*, 99: 302-313.

Hu, Q. 2004. Environmental Effects on Cell Composition. En: Richmond, A. (Ed), Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science Ltd.

Hu, H. & Gao, K. 2003. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis sp.*, with enriched carbon sources. *Biotechnology Letters*, 25:421–425.

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

Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X. & Chen, G. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 87:38–46.

Huppe, H.C. & Turpin, D.H. 1994. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45:577-607.

Illman, A.M., Scragg, A.H. & Shales, S.W. 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microbiology Technology*, 27:631–635

Jeong, M.L., Gillis, J.M. & Hwang, J.Y. 2003. Carbon Dioxide Mitigation by Microalgal Photosynthesis, ull. *Korean Chemical Society*, 24(12):1763-1768.

- Jeon, Y., Cho, C. & Yun, Y.** 2006. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:490-495.
- Johnson, D.T. & Taconi, K.A.** 2007. The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environmental Progress*, 26: 338-348.
- Kalia, V.C. & Purohit, H.J.** 2008. Microbial diversity and genomics in aid of bioenergy. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*. 35: 403-419.
- Kanno, T. & Kazie, U.** 2005. *Chlorella vulgaris*: The Powerful Japanese Medicinal Green Algae as a Biological Response Modifier. *Woodland Publishing*. 63 p.
- Kaplan, D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z. & Aaronson, S.** 1986. Algal nutrition. En: Richmond, A. (Ed.), Handbook for Microalgal Mass Culture. CRC Press, Boca Raton, FL., USA, pp. 147-198.
- Kaya, M., Goulet, V., Noie, J. & Picard, G.** 1996. Effect of intermittent CO₂ enrichment during nutrient starvation on tertiary treatment of wastewater by alginate-immobilized *Scenedesmus bicellularis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 18:550-554.
- Khotimchenko, S.V. & Yakovleva, I.M.** 2005. Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry*, 66:73–79.
- Kobayashi, M., Kakizono, T. & Nagai, S.** 1993. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Applied Environmental Microbiology*, 59: 867–873
- Lee, R.E.** 2008. Phycology. Fourth edition, Cambridge University Press, New York. 547 pp

- Lee, Y.K.** 2004. Algal nutrition. Heterotrophic carbon nutrition. En: Richmond, A. (Ed.), Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publishing, Oxford, UK, p. 116.
- Lee, Y. & Zhang, D.** 1999. Production of astaxanthin by *Haematococcus*. *Chemicals from Microalgae*, 41–56.
- Liang, Y. N., Sarkany, N. & Cui, Y.** 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnological Letters*, 31:1043–1049.
- Loera-Quesada, M.M. & Olguín, E.J.** 2010. Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Revista latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 1(1):91-116.
- Ma, F.R. & Hanna, M.A.,** 1999 Biodiesel production: a review. *Bioresources Technology*, 70:1–15.
- Mallick, N.** 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *BioMetals*, 15:377–390.
- Mandalam, R.K. & Palsson, B.Ø.,** 1998. Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures. *Biotechnology & Bioengineering*, 59:605-611.
- Martínez, F. & Orus, M.** 1991. Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM101. *Plant Physiology*, 95:1150–1155.
- Martínez, M.E., Jiménez, J.M. & Farida, E.Y.** 1997. Influence of phosphorus concentration on the growth kinetics and stoichiometry of the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Process Biochemistry*, 32(8):657-664.
- Márquez, F., Sasaki, K., Kakizono, T., Nishio, N. & Nagai, S.** 1993. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76:408-410.

- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q. & Xian, M.** 2008. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 34:1-5.
- Merrett, M.J. & Syrett, P.J.** 1960. The Relationship Between Glucose Oxidation and Acetate Oxidation in *Chlorella vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 13:237–249.
- Morais, M.G. & Costa, J.** 2007. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy Convers Manage*, 48: 2169-73.
- Morris, I. & Syrett, P.J.** 1965. The Effect of Nitrogen Starvation on the Activity of Nitrate Reductase and other Enzymes in *Chlorella*. *Journal of Genetic Microbiology*, 38: 21-28.
- Nascimento, I.A., Marques, S.S.I., Cabanelas, I.T.D., Pereira, S.A., Druzian, J.I., de Sousa, C.O., Vich, D.V., de Carvalho, G.C. & Nascimento, M.A.** 2012. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *BioEnergy Research*, [publicación en línea: 26 Mayo 2012]:1-13.
- Neilson, A.H. & Lewin, R.A.** 1974. The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry. *Phycologia*, 13: 227-264.
- Nichols, B.W., James, A.T. & Breuer, J.** 1967. Interrelationships between fatty Acid biosynthesis and acyl-lipid synthesis in *Chlorella vulgaris*. *Journal Biochemistry*, 104:486–496.
- OECD.** 2011. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. OECD Publishing.25 pp.
- Ogawa, T. & Aiba, S.** 1981. Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 23:1121–1132.

- Orosa, M., Valero, J.F., Herrero, C. & Abalde, J.** 2001. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under *N*-starvation and high light conditions. *Biotechnology Letters*, 23:1079–1085.
- Payne, J. & Morris, J.** 1969. Acetate utilization by *Rhodospseudomonas spheroides*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 4(1):52-54.
- Pérez-García, O., Escalante, F.M., de-Bashan, L.E. & Bashan, Y.** 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Resources*, 45(1):11–36.
- Pinto, A., Guarieiro, L., Rezende, M., Ribeiro, N., Torres, E., Lopes, W., Pereira, P. & De Andrade, J.** 2005. Biodiesel: An Overview. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 16:1313-1330.
- Piorreck, M., Baasch, K.H. & Pohl, P.** 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, 23: 207-216.
- Pyle, D.** 2008. Use of Biodiesel-Derived Crude Glycerol for the Production of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids by the Microalga *Schizochytrium limacinum*. Director : Zhiyou Wen. Tesis de maestría. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute and State University, *Biological Systems Engineering*.
- Pyle, D., Garcia, R. & Wen, Z.** 2008. Producing Docosahexaenoic Acid (DHA)-Rich Algae from Biodiesel-Derived Crude Glycerol: Effects of Impurities on DHA Production and Algal Biomass Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:3933-3939.
- Pringsheim, E. & Wiessner, W.** 1960. Photo-assimilation of acetate by green organisms. *Nature*, 188:919–921.

Quiao, H & Wang, G. 2009. Effect of carbon source on growth and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana* GXNN01. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 27(4):762-768.

Ratledge, C., Kanagachandran, K., Anderson, A., Grantham, D. & Stephenson, J. 2001. Production of Docosaehexaenoic Acid by *Cryptocodinium cohnii* Grown in a pH-Auxostat Culture with Acetic Acid as Principal Carbon Source. *Lipids*, 36(11):1241- 1246.

Ratledge, C. & Wynn, J.P. 2002. The biochemistry and biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 51:1-51.

Rachlin, J.W. & Grosso, A. 1991. The effects of pH on the growth of *Chlorella vulgaris* and its interactions with cadmium toxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 20(4):505-508.

Richmond, A. 2004. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. *Hydrobiologia*, 512: 33–37.

Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. & Tredici, M.R. 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1):100-102.

Rufty, T.W., Huber, S.C. & Volk, R.J. 1988. Alterations in leaf carbohydrate metabolism in response to nitrogen stress. *Plant Physiology*, 88:725-730.

Sánchez, S., Martínez, M., Espejo, M., Pacheco, R., Espinola, F. & Hodaifa, G. 2001. Mixotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with olive-mill wastewater as the nutrient medium. *Journal of Applied Phycology*, 13:443–449.

- Schenk, P., Thomas, S., Stephens, E., Marx, U., Mussnug, J., Posten, C., Kruse, O. & Hankamer, B.** 2008. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *Bioenergy Research*, 1:20–43.
- Somerville, C., Browse, J., Jaworski, J.G. & Ohlrogge, J.B.** 2000. Lipids. En: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiology, Rockville, MD, USA, pp.465-527.
- Song, D., Fu, J. & Shi, D.** 2008. Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel. *Chinese Journal of Biotechnology*, 24: 341–348.
- Statsoft Inc.** 2004. STATISTICA 7.0. [Programa informático]. Disponible en: <http://www.statsoft.com/>
- Suh, I.S. & Lee, C.** 2003. Photobioreactor engineering: design and performance. *Biotechnology Bioprocess Engineering*, 8: 313-321.
- Sukenik, A., Carmeli, Y. & Berner, T.** 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal of Phycology*, 25:686–692.
- Sukenik, A.** 1999. Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis*. *Chemicals from Microalgae*, 41–56.
- Syrett, P.I.** 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences*, 210:182-210
- Syrett, P.** 1988. Uptake and utilization of nitrogen compounds En: Rogers, L.J. & Gallons, J.R. (Eds), p 23–37. *Biochemistry of the algae and cyanobacteria*. Oxford Science, Oxford.
- Syrett, P., Bocks, S. & Merrett, M.** 1963. The Assimilation of Acetate by *Chlorella vulgaris*. *Journal of Experimental Botany*, 36-47.

- Thompson, G.A.** 1996. Lipids and membrane function in green algae. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1302:17-45.
- Turpin, D.H.** 1991. Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *Journal of Phycology*, 27:14-20.
- Vazhappilly, R., & Chen, F.** 1998. Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75:393–397.
- Van den Hoek, C.** 1981. Chlorophyta: morphology and classification. The Biology of seaweeds, ed. C.S Lobban & Wynne, M.J. pp. 86-132. Blackwell, Oxford.
- Vicente, G., Martinez, M. & Aracil, J.** 2004. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresource Technology*, 92:297-305.
- Wang, L., Li, Y., Chen, P., Min, M., Chen, Y., Zhu, J. & Ruan, R. R.** 2010. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella sp.* *Bioresource Technology*, 101:2623–2628.
- Williams, P. B.** 2007. Biofuel: microalgae cut the social and ecological costs. *Nature*, 450:478.
- Wen, Z.Y., Jiang, Y. & Chen, F.** 2003. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, 21:273–94.
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G. & Ying-xue, S.** 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* *Bioresource Technology*, 101(14):5494-5500.
- Yang, C., Hua, Q. & Shimizu, K.** 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-

autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 102-106.

Yuan-Kun, L. 2001. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*, 13:307-315.

Yuan-Kun, L., Sun-Yeun, D., Chye-Hock, H. & Chin-Seng, L. 1996. Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* in outdoor enclosed photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 8:163-169.

Zar, J.H. 1999. Biostatistical analysis. Cuarta edición. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 663 pp.